

MUTAGENITÄT POLYCYCLISCHER KOHLENWASSERSTOFFE

Erhöhung der cytogenetisch nachweisbaren Schwester-
chromatidaustausche (SCE) und strukturellen Chromosomen-
aberrationen in Knochenmarkszellen des Chinesischen
Hamsters und bei Hemmung der Epoxid-Hydratase in einem
in vitro Aktivierungssystem

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Gabriele Roszinsky-Köcher
aus Mönchengladbach

1979
1

Düsseldorf 1978

Digitized by the Internet Archive
in 2026

MUTAGENITÄT POLYCYCLISCHER KOHLENWASSERSTOFFE

Erhöhung der cytogenetisch nachweisbaren Schwester-
chromatidaustausche (SCE) und strukturellen Chromosomen-
aberrationen in Knochenmarkszellen des Chinesischen
Hamsters und bei Hemmung der Epoxid-Hydratase in einem
in vitro Aktivierungssystem

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Gabriele Roszinsky-Köcher
aus Mönchengladbach

Düsseldorf 1978



1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Röhrborn

2. Berichterstatter: Prof. Dr. O. Hess

Tag der mündlichen Prüfung: 8.2.1979

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Struktur und Metabolisierung der Testsubstanzen	7
2.1 Cyclophosphamid	7
2.2 8-Äthoxycoffein	7
2.3 Polycyclische Kohlenwasserstoffe: Anthracen, Benz(a)pyren, Benz(e)-pyren und Benz(b)fluoranthren	9
2.4 Cyclohexenoxid	12
3. Material und Methoden	13
3.1 Chemikalien und Abkürzungen	13
3.2 Tiermaterial	15
3.3 Applikation der Testsubstanzen	15
3.4 Schwesterchromatidaustausch (SCE) in vivo	17
3.4.1 Behandlung der Tiere	19
3.4.2 Aufarbeitung der Knochenmarkszellen Chinesischer Hamster zur Analyse der Chromosomenstruktur	20
3.4.3 Hoechst/Giemsa-Färbung nach Epplen et al (1975)	21
3.4.4 Auswertung der Präparate	24
3.5 Analyse struktureller Chromosomenaberrationen	25
3.5.1 Auswertung der Präparate	25
3.6 In vitro Versuche mit dem Epoxid-Hydratase-Inhibitor Cyclohexenoxid	29
3.6.1 Zelllinie	29
3.6.2 Kulturbedingungen	29
3.6.3 Versuchsablauf	29
3.6.4 Auswertung der Präparate	31

	Seite
4.	Ergebnisse 32
4.1	In vivo Untersuchungen 32
4.1.1	Prüfung der SCE-Präparate auf die Qualität der Färbung sowie auf die SCE-Frequenz pro Metaphase bei Applikation verschiedener BrdU-Konzentrationen 32
4.1.2	Nachweis der Sensitivität des SCE-Testes am Beispiel von Cyclophosphamid 34
4.1.3	Erhöhung der SCE-Frequenz und strukturellen Chromosomenaberrationen im Knochenmark des Chinesischen Hamsters durch 8-Äthoxycoffein 39
4.1.4	SCE-Erhöhung durch die polycyclischen Kohlenwasserstoffe Anthracen, Benz(a)pyren, Benz(e)pyren und Benz(b)fluoranthren 45
4.1.5	Analyse struktureller Chromosomenaberrationen bei Applikation von Anthracen und Benz(a)pyren 47
4.2	In vitro Untersuchungen 49
4.2.1	Erhöhung der SCE-Frequenz und Zahl der strukturellen Chromosomenaberrationen bei Hemmung der Epoxid-Hydratase durch Cyclohexenoxid in einem in vitro Aktivierungssystem 49
4.2.1.1	Karyotyp der CHO-Zellen 50
4.2.1.2	Wirkung des Epoxid-Hydratase-Inhibitors Cyclohexenoxid auf die SCE-und chromosomale Aberrationsrate 51
5.	Diskussion 55
5.1	Sensitivität des SCE-Testes, Vor- und Nachteile dieser Methode 55
5.2	Mutagenität polycyclischer Kohlenwasserstoffe 61
5.3	Hemmung der Epoxid-Hydratase in vitro 64
5.4	Antworten auf die Problemstellung 68
6.	Zusammenfassung 69
7.	Literaturverzeichnis 71

1. Einleitung und Problemstellung

Viele in der Umwelt vorkommende Substanzen haben sich nicht nur als cancerogen, sondern auch als mutagen erwiesen. Zu diesen Substanzen zählen auch die polycyclischen Kohlenwasserstoffe, die im Zigarettenrauch, geräucherten Lebensmitteln, Speisefett u.ä. zu finden sind (z.B. Clar 1964). Die cancerogene Wirkung polycyclischer Kohlenwasserstoffe wurde schon früh (Henry 1947, Badger 1948) erkannt und in nachfolgenden Untersuchungen ausführlich beschrieben (Huggins et al 1964, IARC 1973). Seit der Feststellung, daß 90 % der cancerogenen Substanzen auch eine mutagene Wirkung im Salmonella/Mikrosoomentest (Mc Cann 1975) haben, ist man daran interessiert, eine Korrelation beider Effekte auch in anderen Systemen nachzuweisen, insbesondere, da die klassische Prüfung auf Cancergenität im Ganztierversuch Jahre erfordert, während Mutagenitätstests schnell durchgeführt werden können. Die Entwicklung und Anwendung neuer und empfindlicher Testmethoden steht daher im Vordergrund der Mutationsforschung.

Die Erfassung der mutagenen Wirkung einer Substanz kann durch die Analyse von Punktmutationen als auch der Strukturveränderung der Chromosomen in vivo und in vitro erfolgen. Jedoch können aufgrund der fehlenden Metabolisierung der verabreichten Stoffe die in vitro-Ergebnisse nicht ohne weiteres auf den Säugerorganismus übertragen werden. Cyclophosphamid z.B. bedarf der metabolischen Aktivierung durch Leberenzyme und ist deshalb in vitro inaktiv, wenn diese dem Testsystem nicht zugefügt werden. Daher sind für Mutagenitätsuntersuchungen in vivo Versuche unerläßlich.

In der Cytogenetik gibt es Testsysteme zur Erfassung numerischer Aberrationen (z.B. Metaphase-II-Oozytentest) als auch

speziell zur Analyse struktureller Chromosomenaberrationen. Letztere sind sowohl als Chromatidtypaberrationen als auch nach weiterer semikonservativer DNA-Replikation als Chromosomentypaberrationen sichtbar. Die Einteilung der im Lichtmikroskop nachweisbaren Aberrationstypen erfolgt in Gaps, Brüche, Fragmente, Deletionen und Austauschfiguren (Exchanges). Zur Erfassung ausschließlich chromosomaler Fragmente steht außerdem der Mikronucleustest (Matter und Grauwiler 1974) zur Verfügung, der eine Präparation von Metaphasechromosomen nicht erfordert. Die Erkennung struktureller Chromosomenaberrationen mittels Lichtmikroskopie ist bei Analyse der Metaphasechromosomen höherer Säuger auf eine Chromosomenbande (etwa 5×10^6 Nucleotide, Savage 1975) beschränkt.

Neben der Erfassung struktureller Chromosomenaberrationen im klassischen Sinn gibt es ein weiteres cytogenetisches Verfahren, welches nach den bisherigen Untersuchungen die mutagene Wirkung des verabreichten Stoffes widerspiegelt, der Nachweis von induzierten Schwesterchromatidaustauschprozessen (SCE). SCE wurden erstmals von Taylor (1958) mittels H^3 -Thymidineinbau und anschließender Autoradiographie bei Zellen nachgewiesen, die zwei Replikationszyklen in radioaktiv markiertem Thymidin durchlaufen hatten. Taylor führte die Bildung der SCE auf crossing over Ereignisse der Chromatiden zurück. Da jedoch die Sekundärstrahlung des H^3 -Thymidins auch zu Chromosomenaberrationen führt, war nicht auszuschließen, daß die beobachteten Austausche auf den H^3 -Thymidineinbau zurückgingen. Der Nachweis der SCE mittels BrdU-Einbau und der kombinierten Hoechst/Giemsa-Färbung (Latt 1974, 1975) ließ schließlich den Zusammenhang zwischen der SCE-Induktion und der mutagenen Wirkung einer Substanz klar erkennen. Perry und Evans (1975) testeten ein breites Spektrum mutagener und cancerogener Stoffe auf ihre Fähigkeit, die SCE-Frequenz pro Metaphase in Zellkulturen zu erhöhen. Sie stellten fest, daß sich die Austauschrate

nach Mitomycin C Behandlung bei einer Konzentration von $10^{-8}M$ verdoppelte. Bei dieser Konzentration waren noch keine Chromosomenaberrationen festzustellen, was auf eine hohe Sensitivität des Testsystems hinwies.

Die erleichterte Technik bei der BrdU/Hoechst-Methode erlaubte im folgenden die Entwicklung einer in vivo Methode, die die Untersuchung mutagener Substanzen, die einer metabolischen Aktivierung bedürfen, ermöglicht. Vogel und Bauknecht (1976) entwickelten eine in vivo SCE-Methode, die in der vorliegenden Arbeit in leicht modifizierter Form zur Untersuchung der Wirkung polycyclischer Kohlenwasserstoffe auf die SCE-Frequenz in Knochenmarkszellen des Chinesischen Hamsters angewendet wurde. Die Arbeitsgruppe um Vogel verglich die in vivo SCE-Methode mit dem Mikronucleustest und stellte eine 10-100 mal größere Sensitivität des erstgenannten Testsystems fest. Da mit dem Mikronucleustest nur der Nachweis chromosomaler Fragmente möglich ist, ergab sich die Frage, ob ein derartiger Sensitivitätsunterschied auch bei Vergleich der SCE-Methode mit der Zahl der auftretenden Chromosomenaberrationen im klassischen Sinne wie Gaps, Brüchen, Fragmenten, Deletionen und Austauschfiguren aufzufinden ist. Die Beantwortung dieser Frage wurde durch Anlegung entsprechender Versuchsreihen zuerst vorgenommen.

Obwohl bisher eine gute Korrelation zwischen den Ergebnissen der SCE-Methode und dem Auftreten von strukturellen Chromosomenaberrationen nach Einwirkung mutagener Substanzen besteht, so wirft doch die SCE-Methode zwei grundlegende Fragenkomplexe auf. So liegt bis heute die Bedeutung und Entstehung der SCE noch völlig im Unklaren. Für SCE sind nur dann genetische Folgen zu erwarten, wenn ungleiche crossing over Ereignisse zu Duplikationsdeletionen führen würden. Diese können allerdings mit cytogenetischen Methoden nicht nachgewiesen werden. Die Problematik der SCE-Entstehung wurde zuerst deutlich, als Solomon und Bobrow (1975) feststellten, daß γ -Strahlen zwar zu Chromosomenaberrationen, nicht aber zu einer Erhöhung der SCE-Rate

fürten. Zunächst hatte man vermutet, daß die Erhöhung der SCE-Rate den ersten Schritt zur Bildung von Chromosomenaberrationen darstellt, nun aber sprach dieses Versuchsergebnis für das Vorhandensein zweier verschiedener Phänomene, was die Entwicklung mehrerer Modelle veranlaßte. Kato (1977) führt die SCE-Bildung auf zwei nebeneinander existierende Mechanismen zurück. Der erste Mechanismus führt an Replikationspunkten oder unmittelbar benachbarten Regionen zu einem Austausch der Schwesterstränge, der zweite beschreibt einen Vorgang, der bei Reparaturprozessen der DNA nach erfolgter Replikation (post replicational repair) in der Weise einsetzt, wie bei Eukaryonten für crossing over Modelle angenommen wird. Hinweise auf die SCE-Entstehung bei DNA-Reparaturprozessen lieferten Ergebnisse von Kato (1974 a). In seinen Untersuchungen nahm die SCE-Rate nach UV-Bestrahlung oder Behandlung mit Mitomycin C und nachfolgender Coffeinbehandlung in Chinesischen Hamsterzellen ab, während die Rate für strukturelle Chromosomenaberrationen anstieg. Da Coffein vermutlich an partiell denaturierte DNA-Regionen bindet (Domon et al 1970), die durch UV-Bestrahlung bzw. Mutagenbehandlung entstehen, wird eine Interaktion der DNA-Stränge und damit die DNA-Reparatur in diesen Bereichen behindert, so daß letztlich weniger SCE entstehen. Jedoch sind die Versuchsergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die mit Coffeinnachbehandlung bei Pflanzen - (Kihlman 1975, Kihlman und Sturelid 1978) sowie Säugerzellen in Kultur (Palitti und Becchetti 1977) erzielt wurden, sehr widersprüchlich. Beide Autorengruppen fanden keine Senkung der SCE-Frequenz.

Während Kato (1977) in seinem Modell zwei verschiedene Mechanismen zur SCE-Entstehung anbietet, begrenzt Shafer (1977) die Induktion von Schwesterchromatidaustauschprozessen ausschließlich auf vorhandene "crosslinks" zwischen den DNA-Strängen während der Replikation (bypass model).

Viele der im Säugerorganismus als mutagen und cancerogen identifizierten Substanzen stellen selbst nur Promutagene dar, welche nach Metabolisierung erst ihre biologische Aktivität entfalten. Zu diesen Substanzen gehören auch die polycyclischen Kohlenwasserstoffe, deren Abbau im Säuger vorwiegend über die mikrosomalen Enzyme der Leber (Grover und Sims 1968) erfolgt. Monooxygenasen bilden aus dem Promutagen ein Epoxid (Jerina et al 1970), Epoxid-Hydratasen wandeln dieses in die zugehörigen Diole um (Review article: Oesch 1973b). Bisher durchgeführte Studien (Grover et al 1972, Huberman et al 1971) schreiben sowohl den Epoxiden als auch den Diolen eine mutagene Wirkung zu, so daß der biologisch aktive Metabolit bisher noch unbekannt ist. In der vorliegenden Arbeit wurde nun versucht zur Klärung dieses Problems beizutragen. Dazu wurde die mutagene Wirkung von Benz(a)pyren unter besonderer Berücksichtigung der entstehenden Metabolite in einem in vitro Aktivierungssystem untersucht. Hierbei wurde die mikrosomale Epoxid-Hydratase durch Cyclohexenoxid nicht kompetitiv gehemmt und die Wirkung der Enzymhemmung anhand der Erhöhung der SCE-Frequenz sowie der strukturellen Aberrationsrate verfolgt. Da unter diesen Bedingungen die Umwandlung der Benz(a)pyren-Epoxide in die Diole weitgehend verhindert wird, würde eine Steigerung der Mutagenität auf die mutagene Potenz der Epoxide hinweisen.

Die hier beschriebenen Untersuchungen sollten also zusammengefaßt zur Klärung folgender Fragen beitragen:

- a. Ist der SCE-Test sensitiver im Vergleich zur Induktion struktureller Chromosomenaberrationen wie Gaps, Brüchen, Fragmenten, Deletionen und Austauschfiguren?
Zur Abgrenzung der Sensitivitätsbereiche beider Methoden wurde das als mutagen bekannte Cyclophosphamid verwendet.
- b. Läßt sich mit diesen Testsystemen eine mutagene Wirkung der polycyclischen Kohlenwasserstoffe nachweisen?
Dazu wurde die stark cancerogene Substanz Benz(a)pyren, die schwächer cancerogenen Stoffe Benz(b)fluoranthren und Benz(e)pyren und die nicht cancerogene Substanz Anthracen ausgewählt.

Die mit dem SCE-Test erzielten Ergebnisse für Benz(a)pyren und Anthracen wurden mit der unter äquivalenten Versuchsbedingungen erreichten Steigerung der chromosomalen Aberrationsrate verglichen.

- c. Welche Rolle spielen die durch Monooxygenasen gebildeten Epoxide der polycyclischen Kohlenwasserstoffe bei der Erhöhung der SCE-Frequenz und Steigerung der chromosomalen Aberrationsrate ?

Diese Frage wurde in einem in vitro Aktivierungssystem mit Benz(a)pyren bei Hemmung der Epoxid-Hydratase durch Cyclohexenoxid untersucht.

2. Struktur und Metabolisierung der Testsubstanzen

2.1 Cyclophosphamid

Cyclophosphamid (N,N-Bis(2-chloräthyl)-N,O-propylenphosphorsäureesterdiamid) ist ein alkylierendes Agens, das unter den Handelsnamen Cytoxan[®] und Endoxan[®] Verwendung findet. Die Substanz (Abb. 1) wird durch die mischfunktionelle Oxygenase der Lebermikrosomen in die aktiven Metabolite umgewandelt. Die cytostatische Wirkung ist wahrscheinlich auf die Bildung von N,N-Bis(2-chloräthyl)phosphordiamidsäure zurückzuführen (Review Artikel Mohn und Ellenberger 1976).

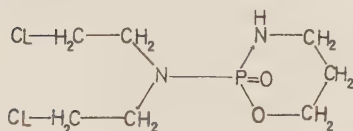


Abb. 1: Struktur des Cyclophosphamids

2.2 8-Äthoxycoffeine

8-Äthoxycoffein (Abb.2) ist ein Derivat des Coffeins (1,3,7-Trimethylxanthin). Coffein und andere methylierte Xanthine werden rasch im Gastrointestinaltrakt absorbiert und auf die Organe verteilt (Kihlman 1974). Nach Abspaltung der Methylgruppen, die zur de novo Synthese von Thymin, Guanin und Adenin verwendet werden (Goth und Cleaver 1976), erscheinen die Endprodukte als 1-Methylharnsäure und 1-Methylxanthin im Urin (z.B. Cornish und Christman 1975). Den Oxypurinen werden verschiedene Effekte zugeschrieben, wie die Induktion von Chromosomenaberrationen in Zellkulturen (Kihlman 1971 a,b), die Inhibierung von

DNA-Reparaturprozessen in UV-bestrahlten Zellen (Lehmann und Kirk-Bell 1974) und Hemmung der Phosphodiesterase (Sutherland und Rall 1958). Nach Kihlman (1975) werden durch 8-Äthoxycoffein in den Wurzelspitzen von *Vicia faba* kaum SCE, aber in starkem Ausmaß Chromosomenaberrationen induziert. Die Wirkung von 8-Äthoxycoffein scheint außerdem von der Temperatur stark abhängig zu sein. In *Vicia faba* nimmt die Zahl der auftretenden Chromosomenaberrationen mit steigender Temperatur ab. Die Prophase der Mitose und die G_2 -Phase des Zellzyklus sind offensichtlich bei Behandlung mit Coffein und 8-Äthoxycoffein bei 17°C die sensitiven Stadien. Bei Behandlung Chinesischer Hamsterzellen mit 8-Äthoxycoffein werden nach Kihlman (1971 a,b) bei 37°C vorwiegend Brüche und bei 17°C Austauschfiguren induziert, so daß die Wirkung der methylierten Oxypurine in Pflanzen- und Säugerzellen auf zwei Mechanismen zurückgeführt werden kann.

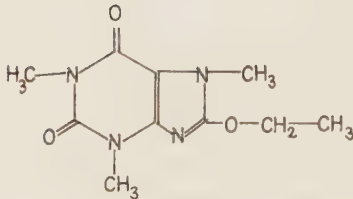


Abb. 2: Struktur des 8-Äthoxycoffeins

2.3 Polycyclische Kohlenwasserstoffe: Anthracen, Benz(a)pyren, Benz(e)pyren und Benz(b)fluoranthren

Die polycyclischen Kohlenwasserstoffe, insbesondere Benz(a)pyren (B(a)P), erwiesen sich bereits in frühen Untersuchungen (Henry 1947, Badger 1948) als cancerogen. B(a)P (Abb.4, 3,4-Benzpyren) und Benz(e)pyren (B(e)P, 1,2-Benzpyren, Abb.5) leiten sich vom Pyren ab, einer aus vier Benzolmolekülen bestehenden Verbindung (Abb.3), die selbst keine cancerogene Wirkung zeigt (Clar 1964). Anthracen (Abb. 6 ,A) baut sich aus drei Benzolmolekülen auf und zeigt im Gegensatz zu B(a)P und B(e)P keine Aktivität bei der Induktion von Tumoren (Clar 1964). Benz(b)fluoranthren (B(b)F, 3,4-Benzfluoranthren, Abb.7) erzeugt ebenfalls Tumore, jedoch ist die cancerogene Wirkung geringer als die des B(a)P (IARC 1973).

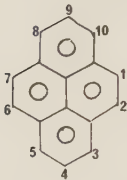


Abb. 3: Pyren

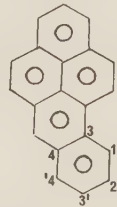


Abb.4: Benz(a)pyren =
3,4-Benzpyren (B(a)P)

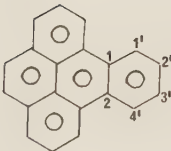


Abb.5: Benz(e)pyren =
1,2-Benzpyren (B(e)P)

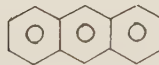


Abb.6: Anthracen (A)

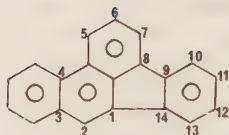


Abb.7: Benz(b)fluoranthen =
3,4-Benzfluoranthen (B(b)F)

B(a)P ist der meist untersuchte polycyclische Kohlenwasserstoff, der verschiedene biologische Aktivitäten zeigt (Toxizität, Mutagenität, Cancerogenität). Die Vermutung, daß nicht B(a)P selbst, sondern erst die durch Metabolisierung entstehenden Zwischenprodukte für die biologische Aktivität verantwortlich sind, führte dazu, daß der Abbauweg des B(a)P im Organismus eingehend untersucht wurde (Zusammenfassung siehe Yang et al 1977). B(a)P wird vorwiegend durch die mikrosomalen Leberenzyme stereospezifisch umgewandelt. Der die Metabolisierung initiiierende Schritt beinhaltet die Epoxidierung durch die mischfunktionelle Oxygenase in der 4,5 -7,8- oder 9,10 Position der planaren Seite des B(a)P-Moleküls. Dem gebildeten Epoxid stehen im Organismus verschiedene Reaktionsmöglichkeiten zur Verfügung:

- a. Reaktion mit dem Chromatin des Zellkerns, wodurch die mutagene/cancerogene Wirkung hervorgerufen wird (Brodie et al 1971)
- b. Konjugation mit Glutathion (Jerina et al 1971) .
Hierdurch wird der gebildete Metabolit einer Reaktion mit dem Zellkern entzogen.
- c. nicht-enzymatische Umwandlung in die entsprechenden Phenole (Jerina et al 1971)
- d. enzymatische Umwandlung in die Dihydrodiole durch Epoxid-Hydratasen (Oesch et al 1971b)

Die in der Cytochrom P450/448 Fraktion der Lebermikrosomen nachweisbare Aktivität der Epoxid-Hydratase führt zur Umwandlung der Epoxide in die optisch reinen (-)Enantiomere der trans-4,5 - trans-7,8 - und trans-9,10-Diole. Nach Oesch (1971a) ist die Epoxid-Hydratase-Aktivität nicht in allen Spezies gleich, so daß, falls die gebildeten Epoxide alleine für die Mutagenität verantwortlich sind, hier Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies bezüglich der mutagenen Wirkung eines Stoffes zu erwarten sind.

Die durch die Wirkung der Epoxid-Hydratase oder durch die nicht-enzymatische Umwandlung entstandenen Diole können bei Vorhandensein weiterer reaktiver Doppelbindungen nochmals epoxidiert werden, so daß Diol-Epoxide entstehen (Sims et al 1974). Die Bildung des trans-7,8-dihydro-7,8-dihydroxy-9,10-epoxy-Derivats von B(a)P durch mikrosomale Leberenzyme wurde von Yang et al (1977) nachgewiesen. Dieses Diol-Epoxid kann nach Hulbert (1975), wenn es in der syn-Konfiguration vorliegt, zur Bildung eines mit der DNA reagierenden Carbonium-Ions in der C₁₀-Position führen. Danach müßte das in der syn-Form vorliegende Diol-Epoxid von B(a)P eine größere mutagene Wirkung haben als das anti-Isomere. Dies konnte jedoch durch die Untersuchungen von Newbold und Brookes (1976) nicht bestätigt werden. Sowohl das 4,5-Epoxid als auch das syn-Diol-Epoxid von B(a)P zeigten eine mutagene Wirkung; das stärkste Mutagen aberwar zweifellos das anti-Isomere des 7,8-Diol-9,10-Epoxids. Eine Erklärung für diese Diskrepanz kann bisher nicht gegeben werden.

Weinstein et al (1976) untersuchten die Bindungsfähigkeit der B(a)P-Diol-Epoxide an DNA in vitro und in vivo. Während das anti-Isomere sowohl an Poly-G, Poly-A und Poly-C bindet, reagierte die syn-Form vorwiegend mit Poly-G und Poly-A, aber bedeutend weniger mit Poly-C. Osborne et al (1976) stellten eine Reaktion des 7,8-Diol-Epoxids von B(a)P vorwiegend mit der N₂-Position des Guanins fest; Swaisland et al (1974) wiesen beim

Benz(a)anthracen-5,6-oxid eine Reaktion mit Guanin und Adenin nach. Polycyclische Kohlenwasserstoffe scheinen demnach vorwiegend mit Purinbasen in Wechselwirkung zu treten.

2.4 Cyclohexenoxid (C0)

Cyclohexenoxid (2,3-Epoxy-Cyclohexan) wurde von Oesch (1971c) als Inhibitor für die mikrosomale Epoxid-Hydratase beschrieben. Die Substanz (Abb.8) ist selbst relativ inaktiv als Substrat, jedoch ein effektiver Hemmer der Epoxid-Hydratase, wobei der Mechanismus der Hemmung nicht kompetitiv zu sein scheint.

Der Hemmeffekt des Cyclohexenoxids auf die Epoxid-Hydratase verschiedener Spezies bei Verwendung von H^3 -Styrenoxid als Substrat erwies sich unterschiedlich stark. So wurde die Epoxid-Hydratase der Ratte zu 40 %, die des Menschen dagegen nur zu 22 % gehemmt (Oesch 1974), obwohl die Epoxid-Hydratase beider Spezies Cyclohexenoxid nicht als Substrat verwendete. Ebenso waren auch Unterschiede in der Hemmwirkung bei Verwendung verschiedener Kohlenwasserstoffe festzustellen. Cyclohexenoxid wirkte nur hemmend auf die Epoxid-Hydratase, wenn Kohlenwasserstoffe ohne Methyl- und Aminogruppen als Substrat zur Verfügung gestellt wurden (Oesch et al 1977). Die Metabolisierung von B(a)P-4,5-oxid soll durch Hemmung der Epoxid-Hydratase mittels Cyclohexenoxid in Rattenmikrosomen zu 90 % verhindert werden (Oesch et al 1977).



Abb.8: Cyclohexenoxid =
2,3-Epoxy-Cyclohexan (C0)

3. Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Abkürzungen

a. Testsubstanzen

B(a)P,	Benz(a)pyren (3,4-Benz-pyren)	- Eastman
B(e)P,	Benz(e)pyren (1,2-Benz-pyren)	- Biochemisches Institut für Umweltcarcinogene, Ahrensburg, Reinheit 99%
B(b)F,	Benz(b)fluoranthren (3,4-Benzfluoranthren)	- Biochemisches Institut für Umweltcarcinogene, Ahrensburg, Reinheit 99%
A,	Anthracen	- Serva, p.A.
CP,	Cyclophosphamid (Endoxan [®])	- Asta Werke
8-EOC,	8-Äthoxycoffein	- ICN, K & K Laboratories Inc.
CO,	Cyclohexenoxid (1,2-Epoxy cyclohexan)	- Fluka, Reinheit 98%

b. Lösungsmittel

Tricaprylin	- Fluka
Dimethylsulfoxid (DMSO)	- Merck
Gummi arabicum	- Caelo, Caesar & Loretz

c. Basenanaloga

BrdU, 5-Brom-2'-desoxyuridin	- Serva, p.A.
FrdU, 5-Fluordesoxyuridin	- Serva, reinst

d. Zellkulturmedien und Zusätze

DMEM, Dulbecco's modification of

Eagle's medium	-	Seromed
FBS, Fötales Kälberserum	-	Seromed
200 mM Glutamin (100x)	-	Seromed
Penicillin/Streptomycin		
10 000 IU/ml bzw. 10 000 µg/ml		
(100 x)	-	Seromed
1 M HEPES Puffer	-	Flow
D-Glucose-6-Phosphat Na ₂ -Salz	-	Serva, p.A.
NADP, Nicotinamid-adenin-dinucle-		
otid-phosphat Na-Salz	-	Serva, p.A.
HBSS, Hank's balanced salt		
solution (1 x)	-	Seromed
Colcemid 10 µg/ml	-	Seromed
Trypsinlösung 0,25 %	-	Seromed
Colchicin	-	Serva

e. Chromosomenfärbung

Giemsa-Lösung	-	Merck
Bisbenzimid H 33 258 Fluoro-		
chrom	-	Hoechst

3.2 Tiermaterial; Karyotyp des Chinesischen Hamsters

In allen in vivo Versuchen wurden 8-12 Wochen alte Chinesische Hamster (*Cricetulus griseus*) verwendet. Der Chinesische Hamster hat im diploiden Satz 22 gut unterscheidbare Chromosomen : 8 große metazentrische, 6 acrozentrische, 6 kleine metazentrische und 2 Geschlechtschromosomen. Das X- Chromosom ist submetazentrisch und liegt in der Größe zwischen dem Chromosom Nummer 2 und 3, das Y -Chromosom ist ebenfalls submetazentrisch, aber kleiner als das X-Chromosom. Da der Karyotyp des Chinesischen Hamsters hinlänglich bekannt ist, sei in Abb. 9 (S.16) nur das Idiogramm mit Schwesterchromatidaustauschen wiedergegeben.

3.3 Applikation der Testsubstanzen

Die polycyclischen Kohlenwasserstoffe wurden bei oraler Applikation in Gummi arabicum suspendiert. Dazu wurden pro Tier 100 mg Gummi arabicum und eine dem Gewicht des Tieres entsprechende Menge der Testsubstanz mit 0,5 ml aqua dest versetzt und mittels eines Mikrodismembrators von Braun (Melsungen) gut gemischt.

Bei intraperitonealer (i.p.) Applikation erfolgte die Suspendierung der Substanzen in 0,5 ml Tricaprylin pro Tier.

Cyclophosphamid wurde in aqua dest, 8-Äthoxycoffein in Tricaprylin gelöst. Die Applikation der zwei letzten Substanzen erfolgte ausschließlich intraperitoneal.

Den Tieren wurde die Substanz zweimal im Abstand von 2 $\frac{1}{2}$ Stunden verabreicht.

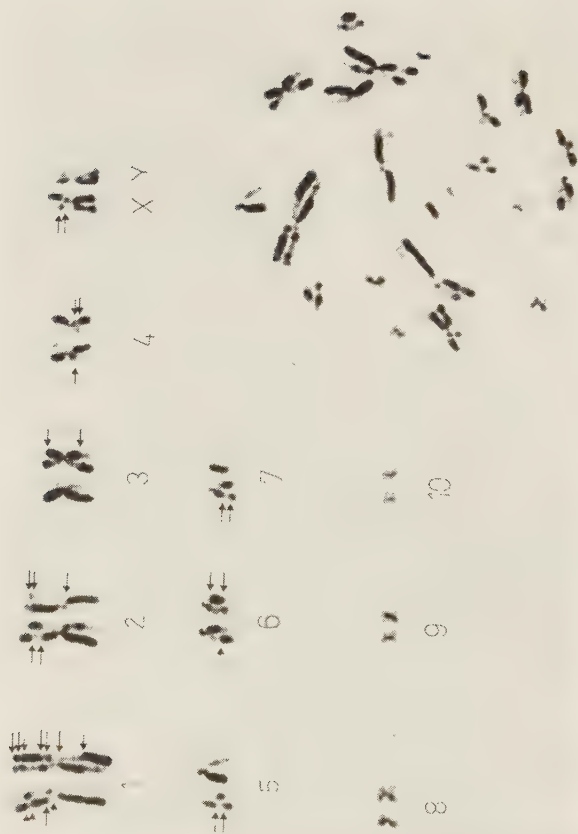


Abb. 9: Karyotyp des Chinesischen Hamsters (♂, Knochenmark) nach BrdU- Einbau und Färbung der Präparate mit Hoechst 33 258 und Giemsa. Pfeile weisen auf Schwesterchromatidaustausche (SCE) hin.

3.4 Schwesterchromatidaustausch (SCE) in vivo

Die mikroskopische Analyse von Rekombinationsprozessen zwischen den Chromatiden eines Chromosoms ist nach einer kombinierten Hoechst/Giemsa Färbung möglich, wenn in einer Chromatide Thymidin durch 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU, Abb. 11) ersetzt wurde (Perry und Wolff 1974). Durch die Anwesenheit von BrdU für den Zeitraum einer S-Phase wird aufgrund der semikonservativen Replikation der DNA das Thymidinanalog BrdU zunächst in beide Chromatiden eingebaut, wohingegen es nach der zweiten S-Phase ohne BrdU nur noch in einer Chromatide zu finden ist (Abb. 10).



Abb. 10: Einbau des Thymidinanalogs BrdU in chromosomale DNA

----- BrdU substituiertes DNA- Strang
 ——— Thymidin enthaltender DNA- Strang

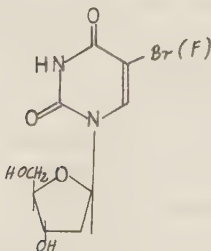


Abb. 11: Strukturformel des BrdU bzw. FrdU

Da BrdU aufgrund der metabolischen Aktivität der Leberenzyme in vivo rasch dehalogenisiert und damit unwirksam wird, muß es laufend ersetzt werden (Habers 1975). Das schnelle Absinken der BrdU- Konzentration im Serum kann weiter durch Gabe von FrdU (Abb. 11) verhindert werden. BrdU wird aufgrund des Atomdurchmessers des Bromatoms anstelle von Thymidin in DNA, nicht aber in RNA eingebaut, während FrdU im Säuger weder in DNA noch in RNA als Nucleotid Verwendung findet. FrdU hemmt die Umwandlung des Desoxyuridinmonophosphats in das Desoxythymidinmonophosphat durch die Thymidinkinase, so daß kein dTTP zur DNA- Synthese zur Verfügung steht (Abb. 12).

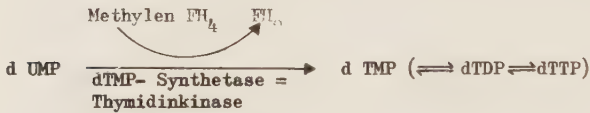


Abb. 12: Hemmung der Thymidinkinase durch FrdU

FH_4 Tetrahydrofolsäure, FH_2 Dihydrofolsäure

Um den für die SCE-Analyse notwendigen BrdU- Einbau zu gewährleisten, erhielten die Versuchstiere stündlich BrdU wie auch FrdU intraperitoneal verabreicht. Die Dauer der S- Phase beträgt bei Zellen der Chinesischen Hamsters etwa 6 Stunden, so daß durch eine neunmalige BrdU/FrdU - Gabe die S- Phase bei einem Teil der Zellen abgedeckt wird. Je nach Fragestellung wurden 4-8 Tiere pro Substanz und Dosis behandelt und gleichzeitig aufgearbeitet. Die Behandlung der Tiere erfolgte nach Vogel und Bauknecht (1976) mit geringen Modifikationen. Das Applikationsschema ist in Tabelle 1 wiedergegeben.

3.4.1 Behandlung der Tiere

Die Versuchstiere erhielten nicht wie bei Vogel und Bauknecht (1976) angegeben sieben, sondern neun BrdU/FrdU Applikationen.

Tabelle 1: Behandlungsschema der Tiere mit BrdU und FrdU zur Erreichung verschieden gefärbter Chromatiden.

Zeit	FrdU $\mu\text{g/g}$	BrdU $\mu\text{g/g}$	Mutagen
0	-	-	1. Applikation
22	40	-	-
24	2	40	2. Applikation
25-32	2	40	-
46	-	-	Colchicin 10 $\mu\text{g/g}$ Körpergewicht
48	-	-	Aufarbeitung des Knochenmarks

Als Stammlösungen wurden dazu angesetzt:

FrdU I	16 mg/10 ml physiologische Kochsalzlösung
	Das applizierte Volumen stieg mit dem Körpergewicht
	25 g Körpergewicht 0,7 ml
	30 g " 0,8 ml
	35 g " 0,9 ml
	40 g " 1,0 ml

FrdU II	2,4 mg/10 ml physiologische Kochsalzlösung
25 g Körpergewicht	0,22 ml
30 g	" 0,25 ml
35 g	" 0,27 ml
40 g	" 0,30 ml

BrdU	24 mg/10 ml physiologische Kochsalzlösung
25 g Körpergewicht	0,40 ml
30 g	" 0,50 ml
35 g	" 0,60 ml
40 g	" 0,70 ml

Colchicin	10 mg/10 ml physiologische Kochsalzlösung
pro 10 g Körpergewicht	0,10 ml

BrdU und FrdU wurden zusammen intraperitoneal appliziert. Zwei Stunden nach der Colchicingabe wurden die Tiere abgetötet und das Knochenmark aufgearbeitet.

3.4.2 Aufarbeitung der Knochenmarkszellen Chinesischer Hamster zur Analyse der Chromosomenstruktur

Die Präparation des Knochenmarks erfolgte nach einer von Schmid und Staiger (1969) beschriebenen und von Miltenburger (persönliche Mitteilung 1976) modifizierten Methode. Zwei Stunden vor der Aufarbeitung erhielten die Tiere 10 mg Colchicin pro kg Körpergewicht. Die Colchicin- Stammlösung wurde bei 4°C aufgehoben und maximal eine Woche verwendet.

Nach Entnahme der Femora wurden diese grob von Fleischresten befreit und das Knochenmark mit 30°C warmer physiologischer Kochsalzlösung ausgespült. Während in das proximale Ende sofort mit einer Injektionsnadel eingestochen werden konnte,

war es notwendig, das distale Ende des Femurs knapp abzuschneiden. Die Ausspülung jedes Femurs erfolgte mit 2 ml; danach wurde die Zellsuspension gut mit einer Pasteurpipette aufgewirbelt. Nach Aufarbeitung der Tiere einer Versuchsreihe (4 bis 8 Tiere) wurden die Suspensionen 5-7 Minuten bei 1000 rpm (Tischzentrifuge) zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgegossen und die Zellen mit etwa 3 ml 1%iger Natriumcitratlösung resuspendiert (= hypotone Behandlung). Nach 20-25 minütiger hypotoner Behandlung bei 30°C im Wasserbad erfolgte abermals eine Zentrifugation der Zellen. Um ein Verklumpen der Zellen zu verhindern, wurde die Umdrehungsgeschwindigkeit auf 800 rpm herabgesetzt. Nach Abgießen des Überstandes erfolgte die Fixierung der Zellen durch eine Äthanol- Eisessig Mischung (1 Teil Eisessig und 2,5 Teile Äthanol). Anschließend verblieben die mit Gummistopfen verschlossenen Röhrchen für 30 Minuten im Kühlschrank. Nach Abzentrifugation der Zellen wurde nochmals frische Fixierlösung zugegeben, danach wurden die Proben für weitere Stunden in den Kühlschrank gestellt. 12 bis 24 Stunden später erfolgte die dritte Fixierung mit etwa 0,5 ml, anschließend wurden die Zellen auf kalte Objektträger aufgetropft, verblasen und abgeflammt. Für die Färbung mittels der Hoechst/Giemsa-Technik erwies sich eine mindestens dreitägige Alterung der Präparate als notwendig.

3.4.3 Hoechst/Giemsa- Färbung nach Epplen et al (1975)

Hoechst 33 258 (Abb. 13) ist ein Bi-Benzimidazol- Derivativ [2- 2-(4-Hydroxyphenyl)-6-Benzimidazol -6 (1-Methyl-4-Piperazyl)- Benzimidazol-Trihydrochlorid] , welches an Poly(dT-dA) gebunden intensiv fluoresziert, während der Fluorochromfarbstoff gebunden an Poly(dA-dBrdU) bei neutralem pH-Wert eine bedeutend schwächere Färbung zeigt (Latt 1973).

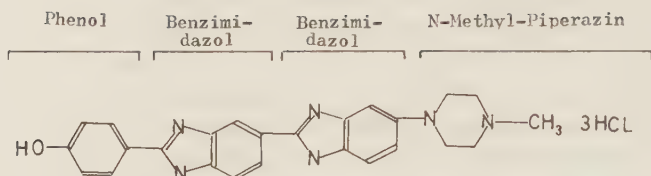


Abb. 13: Strukturformel des Hoechst 33 258 Fluorochrom -
farbstoffes

Nach Comings (1975) bindet der Hoechst-Farbstoff weder durch Interkalation noch durch ionische Bindung an Phosphatgruppen, sondern interagiert an der Außenseite der DNA-Doppelhelix mit den Basenpaaren. Seine Folgerung wird durch folgende Experimente unterstützt:

1. Die Bindung des Hoechst-Farbstoffes führt zu einer Erhöhung der DNA- Schmelztemperatur (T_m), die mit steigendem AT- Gehalt zunimmt.
2. Der Extinktionskoeffizient nimmt ab und das Absorptionsspektrum verschiebt sich zu höheren Wellenlängen, wenn Hoechst-Farbstoff an DNA bindet.
3. Weder die DNA- Viskosität noch der Zirkulardichroismus werden nach Bindung des Hoechst- Farbstoffes verändert.

Da die SCE-Analyse nach Behandlung der Präparate mit dem Hoechst-Farbstoff 33 258 aufgrund der Instabilität der Färbung zeitlich stark begrenzt ist, wurden die Präparate mit einer kombinierten Hoechst/Giemsa Färbung behandelt, so daß die Auswertung auch noch nach Wochen möglich war.

Stammlösungen zur Färbung

10 fach konzentrierte KH_2PO_4 $3,33 \times 10^{-1} \text{ M}$

10 fach konzentrierte $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times$

$2 \text{ H}_2\text{O}$ $4,10 \times 10^{-1} \text{ M}$

Speziallösung bestehend aus: $3,00 \times 10^{-2} \text{ M KCl}$

$1,50 \times 10^{-1} \text{ M NaCl}$

SSC 12 fach konzentriert: $1,80 \text{ M NaCl}$

$1,80 \times 10^{-1} \text{ M Na}_3\text{-Citrat} \times 2\text{H}_2\text{O}$

Hoechst 33 258

$5,0 \text{ mg/ } 100 \text{ ml Spezial-}$
lösung

Die gealterten Präparate wurden 10 Minuten mit einer 1:10 000 verdünnten Hoechst-Stammlösung (verdünnt mit Speziallösung, Endkonzentration $0,005 \mu\text{g/ml}$) gefärbt und danach zweimal gut in gepuffertem aqua dest gespült ($20 \text{ ml KH}_2\text{PO}_4 + 20 \text{ ml Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O} + 160 \text{ ml H}_2\text{O}$). Danach wurden die Objektträger mit der Oberseite nach oben in eine Schale gelegt und etwa 1 cm mit gepuffertem aqua dest bedeckt und 25 Minuten mit der UV Lampe bei 254 nm im Abstand von 20 cm bestrahlt. Es folgte eine 90 minütige Inkubation in SSC 2 fach bei $59-60^\circ\text{C}$ im Wasserbad. Nach Abkühlung der Präparate an der Luft wurden diese 10 Minuten mit einer 7%tigen Giemsa-Lösung (ph-Wert 7,0) gefärbt, an der Luft getrocknet und mit Enkitt eingedeckt.

3.4.4 Auswertung der Präparate

Die Chromatide, die statt Thymidin BrdU in einem DNA-Strang eingebaut hat, fluoresziert nach der Hoechst-Färbung schwächer und färbt sich mit Giemsa heller als die nur Thymidin enthaltende Chromatide. Jedes Chromosom zeigt also nach erfolgreicher Färbung eine hell- und dunkelblaue Chromatide. Pro Tier wurden 40-50 Metaphasen ausgewertet, die die folgenden Bedingungen erfüllen mußten:

1. Alle gewerteten Metaphasen wiesen 22 Chromosomen und keine Aberrationen auf.
2. Bei allen Chromosomen waren die Chromatiden verschieden gefärbt. Eine Ausnahme stellten die Geschlechtschromosomen dar, die aufgrund ihrer späten Replikation in der S-Phase nicht immer erfaßt wurden. Aus diesem Grund wurde die Austauschrate pro Metaphase ohne Geschlechtschromosomen angegeben.
3. Gezählt wurden die Austausche pro Chromosom (= reziproke Farbänderung) und Metaphase, wobei der Austausch eines Mittelstückes als zwei SCE bewertet wurde, da dieses zwei Bruchereignisse voraussetzt. Der Austausch eines Endstückes galt als ein SCE; Austausche genau im Centromer wurden, falls überhaupt vorkommend, nicht gezählt.
4. Die Überprüfung der Signifikanz erfolgte mit dem t-Test.

3.5 Analyse struktureller Chromosomenaberrationen

Zur Analyse der strukturellen Chromosomenaberrationen erhielten die Tiere die Testsubstanz wie in 3.3 beschrieben. Die Aufarbeitung des Knochenmarks erfolgte wie in 3.4.2. Nach dem Lufttrocknen wurden die Präparate mit 5%tiger Giemsalösung (ph-Wert 6,8) gefärbt und später mit Eukitt eingedeckt.

3.5.1 Auswertung der Präparate

Pro Tier gelangten 200 Metaphasen zur Auswertung, wobei nur Metaphasen mit 22 ± 2 gut unterscheidbaren Chromosomen ausgewählt wurden. Die Klassifikation der chromosomalen Strukturveränderungen erfolgte nach Savage (1975). Aberrante Metaphasen wurden entsprechend der Wertigkeitsfolge Exchanges > Brüche, Deletionen, Fragmente > Gaps aufgeführt. Traten in einer Metaphase mehrere Aberrationstypen auf, so wurden diese nur einmal, und zwar unter der Aberrationsform der höheren Wertigkeit berücksichtigt, wodurch nicht streng zwischen Ein- und Mehrtrefferereignissen unterschieden wurde. Pulverisierte Kerne sowie Metaphasen mit multiplen Aberrationen wurden gesondert bewertet. Die Einordnung der Aberrationstypen erfolgte nach folgenden Gesichtspunkten:

1. Als Gap wurden achromatische Lücken (nicht gefärbte Bereiche) in den Chromatiden bezeichnet (Abb. 14). Traten diese auf gleicher Höhe bei beiden Schwesterchromatiden auf, so wurden diese als Isogap vermerkt. Allerdings wurden hierbei die häufig am X-Chromosom auftretenden Isogaps nicht berücksichtigt.

2. Bei Dislokalisierung eines Chromatidenstückes erfolgte die Einordnung als Bruch (Abb. 15). Lag das Chromatidenstück nicht mehr in unmittelbarer Nähe des Chromosomes, galt es als Fragment und das defiziente Chromosom wurde in der Spalte "Deletion" aufgeführt. Das gleichzeitige Auftreten beider Aberrationen in einer Metaphase war jedoch sehr selten, meist war entweder nur ein Fragment oder nur eine Deletion nachweisbar. Nach Rieger-Michaelis (1967) unterteilt man in Deletionen und Defizienzen und zählt erstere zu den Austauschfiguren (Intrachanges). Diese Unterteilung ist jedoch im Rahmen von Mutationsversuchen mit Säugern nicht durchführbar, da die dazu notwendige Analyse des Bandenmusters der Chromosomen einen zu großen Arbeitsaufwand mit sich bringen würde. Wegen des fließenden Überganges von Brüchen, Deletionen und Fragmenten wurden die Deletionen nicht als Intrachanges, sondern zusammen mit den Brüchen und Fragmenten als eine Klasse gewertet.
3. Als Exchanges wurden Austauschfiguren bezeichnet, die das Resultat der Vereinigung von Bruchenden zweier oder mehrerer Chromatidbrüche in zwei oder mehreren Chromosomen darstellen (Abb. 16).
4. Als multipel aberrant galten solche Metaphasen, die mehr als fünf Aberrationen aufwiesen (Abb. 17).

Die unter 1-3 aufgeführten Aberrationen können sowohl vom Chromatiden - als auch vom Chromosomentyp sein.

Die Prüfung der Ergebnisse auf Signifikanz erfolgte mit dem zweiseitigen χ^2 -Test.

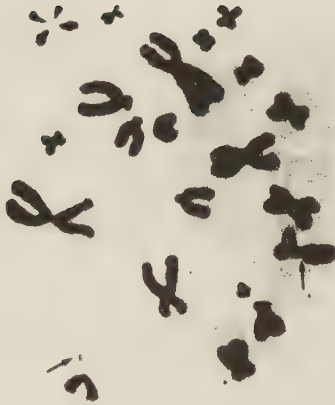


Abb. 14: Metaphase mit Gap und Fragment (minute),
Chinese hamster ovary cells (CHO-Linie)



Abb. 15: Metaphase mit einem Chromatidenbruch, Knochen-
markszelle des Chinesischen Hamsters



Abb. 16: Metaphase mit Gap und Exchange, Knochenmarkszelle des Chinesischen Hamsters

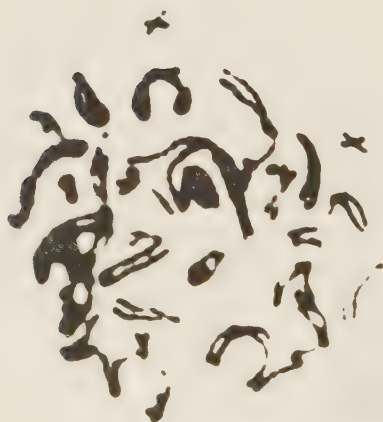


Abb. 17: Metaphase mit multiplen Aberrationen
Chinese hamster ovary cells (CHO-Linie)

3.6 In vitro Versuche mit dem Epoxid-Hydratase-Inhibitor Cyclohexenoxid

3.6.1 Zelllinie

In allen in vitro Versuchen wurden "Chinese hamster ovary cells" (CHO-Linie) verwendet. Diese Zelllinie wurde 1957 von Puck et al isoliert und 1958 erstmals beschrieben. Der Karyotyp ist in Kapitel 4.6.1 (Abb. 21) wiedergegeben.

3.6.2 Kulturbedingungen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Dulbecco's MEM mit 10% (V/V) fötalem Kälberserum. Dem Medium wurde Glutamin (Endkonzentration 2 mM) und Antibiotika (Endkonzentration 100 IU/ml bzw. 100 µg/ml) zugesetzt. Die Zellen wurden bei 5% CO₂ und 36-37°C im CO₂- Inkubator gehalten und je nach Wachstum zwei- bis dreimal in der Woche mit 0,25%tiger Trypsinlösung abgelöst und anschließend verdünnt.

3.6.3 Versuchsablauf

Logarithmisch wachsende Zellen wurden am Tag vor der Mutagenbehandlung auf Kulturgefäße (75 mm², Nunc, 1 x 10⁶ Zellen pro Gefäß) verteilt. Die Bereitung des zur Metabolisierung von B(a)P benötigten S9- Mix erfolgte kurz vor dem Versuch nach Natarajan et al (1976). 16,9 ml des verwendeten S9- Mix bestanden aus folgenden Komponenten:

5,0 ml S9- Fraktion	Diese wurde nach Ames et al (1975) von Phenobarbital induzierten Mäusen (NMRI) bereitet.
---------------------	--

3,4 ml 20 mM HEPES Puffer

1,7 ml 50 mM MgCl₂

1,7 ml 330 mM KCl

1,7 ml 50 mM Glucose-6-Phosphat

1,7 ml 40 mM NADP

1,7 ml bidestilliertes Wasser

Die Kulturen wurden einmal mit HBSS gewaschen und dann mit der die Testsubstanz enthaltenden Lösung behandelt. Diese setzte sich zusammen aus:

2,0 ml S9- Mix

0,1 ml B(a)P in DMSO (Stammlösung $1 \times 10^{-3} \text{M}$)

0,1 ml CO in DMSO (Stammlösung 1×10^{-3} oder $2 \times 10^{-3} \text{M}$)

7,8 ml DMEM ohne Antibiotika und nur 3% Serum

Die Kontrollen erhielten statt des S9- Mix 2,0 ml HEPES Puffer. B(a)P und CO wurde durch je 0,1 ml DMSO ersetzt. Alle Kulturen wurden eine Stunde bei 37°C im CO_2 - Inkubator mit der Testlösung behandelt. Zur Entfernung des S9- Mix war es notwendig, die Zellen anschließend dreimal mit HBSS zu waschen; danach konnte die Kultivierung der Zellen fortgesetzt werden. Zur Analyse der SCE erhielten die Kulturen sofort nach der Behandlung BrdU (Endkonzentration $1 \times 10^{-5} \text{M}$) für 24 Stunden, dann für 5 Stunden Colcemid (Endkonzentration $0,01 \mu\text{g/ml}$). Mitotische Zellen wurden abgeschüttelt und nach 5 minütiger Zentrifugation (1000 rpm) für 15 Minuten mit hypotoner Lösung (1 Teil HBSS und 5 Teile aqua dest) bei 37°C behandelt. Anschließend wurden die Zellen wiederum zentrifugiert und mit einer kalten Äthanol-Eisessig- Mischung (2,5 Teile : 1 Teil) fixiert. Nach der ersten Fixierung blieben die Zellen 30 Minuten im Kühlschrank, danach erfolgten noch zwei Fixierungsschritte unmittelbar hintereinander. Die Zellen wurden auf kalte, fettfreie Objektträger aufgetropft und mit dem Fön getrocknet.

Die Färbung der SCE-Präparate erfolgte wie in den in vivo Versuchen mit dem Hoechst- Farbstoff 33 258 und Giemsa.

Die Analyse struktureller Chromosomenaberrationen wurde an Zellkulturen vorgenommen, die kein BrdU erhalten hatten.

Jedes Experiment wurde mindestens zweimal durchgeführt.

3.6.4 Auswertung der Präparate

Die Auswertung der SCE- Metaphasen erfolgte wie in 3.4.4 beschrieben. Zur Analyse der strukturellen Chromosomenaberrationen wurden die gleichen Bewertungskriterien angewendet wie in 3.5.1 angegeben. Pro Kultur gelangten wenigstens 20 und maximal 50 SCE - Metaphasen bzw. 70 - 100 Giemsa gefärbte Metaphasen zur Auswertung.

4. Ergebnisse

4.1 In vivo Untersuchungen

4.1.1 Prüfung der SCE-Präparate auf die Qualität der Färbung sowie auf die SCE-Frequenz pro Metaphase bei Applikation verschiedener BrdU-Konzentrationen.

Die visuelle Analyse von Schwesterchromatidaustauschen ist ohne BrdU-Einbau nicht möglich. Ein Teil der beobachteten SCE wird daher vermutlich auf die Anwesenheit dieses Basen-analogs zurückzuführen sein. Aus diesem Grunde wurde überprüft, inwieweit die SCE-Frequenz durch die applizierte BrdU-Menge verändert wird. Chinesische Hamster erhielten 20 - 40 - 60 - oder 80 µg BrdU pro g Körpergewicht und Stunde sowie FrdU wie in Tabelle 1 angegeben. Die Präparate der einzelnen Gruppen wurden auf ihre Qualität und SCE-Rate hin überprüft. In keiner Versuchsgruppe war ein Unterschied in der SCE-Frequenz nachzuweisen, jedoch ergaben sich Unterschiede hinsichtlich der Qualität der Präparate (Tabelle 2). Bei der niedrigsten BrdU-Konzentration war die SCE Analyse aufgrund der geringen Farbunterschiede der Chromatiden beträchtlich erschwert; bei Applikation von 40 µg/g/h und mehr zeigten die Präparate eine zufriedenstellende Qualität. Um die Stoffwechselbelastung der Tiere möglichst gering zu halten und gleichzeitig eine gute und zuverlässige SCE Analyse zu gewährleisten, wurde den Tieren in den weiteren Versuchsreihen 40 µg/g/h appliziert.

Tabelle 2: Prüfung der SCE - Präparate auf die Qualität der Färbung sowie auf die SCE - Frequenz pro Metaphase bei Applikation verschiedener BrdU - Konzentrationen.

Chinesische Hamster (♂) erhielten 20 - 40 - 60 - oder 80 µg BrdU pro g Körpergewicht und Stunde.

BrdU µg/g/h	n Tiere	n Meta- phasen	SCE/Meta- phase	Qualität der Färbung
20	2	100	3,6 $\pm$ 0,3	unterschiedliche Färbung der Chroma- tiden gerade noch erkennbar
40	7	350	3,6 $\pm$ 0,5	gut
60	2	100	3,5 $\pm$ 0,2	gut
80	2	100	3,3 $\pm$ 0,1	sehr gut

4.1.2 Nachweis der Sensitivität des SCE-Testes am Beispiel von Cyclophosphamid (CP).

Cyclophosphamid induziert in hohem Maße Chromosomenaberrationen sowohl in Maus-Oozyten (Röhrborn und Hansmann 1971) als auch im Knochenmark des Chinesischen Hamsters (Goetz et al 1975). Mit der Entwicklung des SCE-Systems in vivo erkannten Bauknecht und Vogel (1977), daß nach CP-Gabe auch die SCE-Frequenz erhöht wird. Da die Erhöhung der SCE-Rate bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen sichtbar war, verglichen die Autoren die Sensitivität des SCE-Systems mit der Induktion von Mikrokernen, einem in der Mutagenese etablierten und als Schnelltest angewendetem Verfahren. Sie stellten in ihrer Versuchsreihe eine 10-100 fach größere Sensitivität des SCE-Systems fest. Da im Mikronucleustest allerdings nur Chromosomenfragmente ohne Centromer erfaßt werden, ergab sich die Frage nach der Sensitivität des SCE-Systems im Vergleich zur Induktion von strukturellen Chromosomenaberrationen wie Gaps, Brüchen, Fragmenten, Deletionen und Austauschfiguren. Zur Klärung dieser Frage wurden zwei Versuchsreihen angelegt. Chinesischen Hamstern wurde zweimal 1,0 ; 5,0 ; 13,3 ; 25,0 oder 40,0 mg CP pro kg Körpergewicht intraperitoneal verabreicht. Ein Teil der Tiere erhielt zur Analyse der SCE BrdU, FrdU sowie CP ; die zur Analyse der strukturellen Chromosomenaberrationen im Knochenmark verwendeten Tiere erhielten nur CP, um einen Synergismus zwischen der Testsubstanz und dem Basenalog auszuschließen. Die Ergebnisse der Versuchsreihen sind in Tabelle 3 und 4 dargestellt. Die Kontrolltiere wiesen $4,65 \pm 0,67$ SCE pro Metaphase auf. Die zweimalige Applikation von 1,0 mg CP führte bereits zu einem signifikanten Anstieg der SCE-Rate auf $6,41 \pm 0,41$. Noch deutlicher war die Erhöhung bei Gabe von 5,0 mg CP. Hier stieg die SCE-Rate auf $11,45 \pm 1,31$ an. Die Applikation von 13,3 , 25,0 und 40,0 mg führte zu einem Anstieg auf $14,48 \pm 0,58$, $18,95 \pm 1,48$ bzw. $22,75 \pm 1,06$ SCE/Metaphase. Dagegen war eine Induktion

struktureller Chromosomenaberrationen bei den zwei niedrigsten CP-Konzentrationen noch nicht festzustellen, erst bei Gabe von 13,3 mg/kg stieg der Anteil aberranter Metaphasen von 0,5% auf 2,25% exclusive Gaps an. Die Applikation von 25,0 mg führte zu 7,65% und 40,0 mg zu 15,63% aberranten Metaphasen (exclusive Gaps).

Abbildung 18 und 19 zeigen den unterschiedlichen Verlauf der Dosis-Effekt-Beziehungen. Die SCE-Frequenz steigt schnell an, jedoch verringert sich die Zunahme mit höheren CP-Konzentrationen, so daß die Kurve immer mehr abflacht. Die Induktion struktureller Chromosomenaberrationen erfolgt dagegen geradezu invers. Nach Überschreitung eines Schwellenwertes, der bei 10,0 mg zu liegen scheint, steigt der Anteil aberranter Metaphasen rapide an. Die untere effektive Dosis kann somit im SCE-System mit 1,0 mg/kg, für den Nachweis struktureller Chromosomenaberrationen mit 10,0 mg/kg angegeben werden. Somit ergibt sich bei Vergleich beider Testsysteme eine etwa um den Faktor 10 größere Sensitivität des SCE-Testes.

Tabelle 3:

SCE-Erhöhung in Knochenmarkszellen des Chinesischen Hamsters
nach intraperitonealer Applikation von Cyclophosphamid.

Cyclophosphamid mg/kg	n Tiere	n Meta- phasen	SCE/Meta- phase	Signifikanz (t-Test)
0	4	160	4,65 $\pm$ 0,67	
2 x 1,0	4	160	6,41 $\pm$ 0,41	+
2 x 5,0	4	160	11,45 $\pm$ 1,31	+
2 x 13,3	4	160	14,48 $\pm$ 0,58	+
2 x 25,0	4	160	18,95 $\pm$ 1,48	+
2 x 40,0	4	160	22,75 $\pm$ 1,06	+

+ $P \leq 0,01$

Pro Dosis wurden 2 ♂ und 2 ♀ aufgearbeitet

Tabelle 4:

Erhöhung struktureller Chromosomenaberrationen in Knochenmarkszellen des Chinesischen Hamsters nach intraperitonealer Applikation von Cyclophosphamid.

Cyclophosphamid mg/kg	n Tiere	n Meta- phasen	n Metaphasen mit				% aberranter Metaphasen	
			Gaps	Brüche Fragmente	Exchanges	Deletio- nen	multiplen Aberrationen	
0	4	800	20	4	0	0	0	incl.Gaps 0,50
2 x 1,0	4	800	27	3	0	2	0	4,0 0,63
2 x 5,0	4	800	33	3	0	0	0	4,5 0,38
2 x 13,3	4	800	39	12	2	4	0	7,1 ⁺ 2,25 ⁺
2 x 25,0	4	667	43	40	5	3	3	14,1 ⁺ 7,63 ⁺
2 x 40,0	4	800	101	82	31	5	7	28,3 ⁺ 15,63 ⁺

+ $P \leq 0,005$

Pro Dosis wurden 2 ♂ und 2 ♀ aufgearbeitet

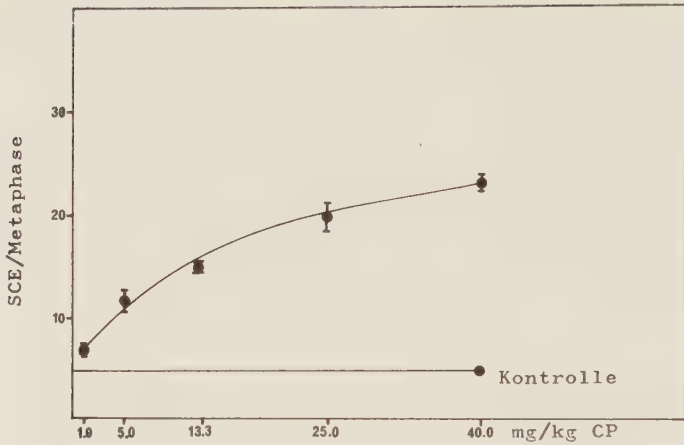


Abb.18 :SCE-Induktion in vivo nach i.p.Applikation von 1,0,5,0,13,3,25,0 und 40,0 mg Cyclophosphamid (CP) pro kg Körpergewicht.Chinesische Hamster erhielten die Testsubstanz 2x im Abstand von 24 h.

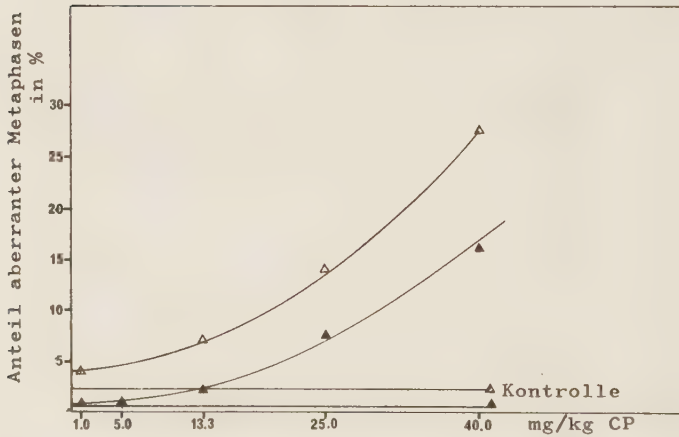


Abb.19 : Induktion von strukturellen Chromosomenaberrationen im Knochenmark des Chinesischen Hamsters bei Applikation von Cyclophosphamid (CP).

△ — inclusiv Gaps
▲ — exclusiv Gaps

4.1.3 Erhöhung der SCE-Frequenz und strukturellen Chromosomenaberrationen im Knochenmark des Chinesischen Hamsters durch 8-Äthoxycoffein (8-EOC).

Die *in vivo* Versuche mit Cyclophosphamid ergaben eine größere Sensitivität des SCE-Systems. Solange aber nur ein relativ kleines Spektrum mutagener Substanzen in dem beschriebenen *in vivo* System untersucht sind, bleibt die Frage offen, ob dieser Sensitivitätsunterschied genereller Natur ist. Die cytogenetische Aktivität mutagener Substanzen kann sich auf verschiedene Weisen zeigen:

- a. Die Substanz induziert sowohl SCE als auch Chromosomenaberrationen
- b. Die Substanz führt nur zu SCE
- c. Die Substanz induziert nur Chromosomenaberrationen

Im Falle von a. wäre evtl. eine klare Dosis-Effekt-Beziehung mit größerer Sensitivität des SCE-Systems nachweisbar (wie z.B. bei CP). b. würde bedeuten, daß entweder zwei grundsätzlich verschiedene Aberrationsmechanismen vorliegen und/oder daß die Substanz höchst toxisch wirkt und deshalb eine cytogenetische Aktivität in niedrigen Konzentrationsbereichen im SCE-Test nachgewiesen werden kann, nicht aber die Induktion von Chromosomenaberrationen (Tod der Tiere, keine Metaphasen mehr). c. würde wiederum auf zwei verschiedene Mechanismen bei der Mutationsauslösung hinweisen.

Einen Anhaltspunkt für c. lieferten *in vitro* Untersuchungen von Kihlman (1975). Er stellte fest, daß 8-EOC in hohem Maße Chromosomenaberrationen, aber keine SCE induziert. Da Kihlman seine Untersuchungen in *Vicia faba* durchführte, wurde im folgenden überprüft, ob die gleichen Resultate auch *in vivo* mit Chinesischen Hamstern erzielt werden. Die Tiere erhielten zweimal im Abstand von 24 Stunden die Substanz intraperitoneal, suspendiert in Tricaprylin. Das Ergebnis ist in Tabelle 5 dargestellt. Die Applikation von 50 mg und 100 mg/kg Körpergewicht

führte zu keiner Steigerung der Anzahl aberranter Metaphasen. Bei Erhöhung der Dosis auf 200 mg/kg stieg die Aberrationsrate von 0,4 auf 1,2 % exclusive Gaps an. Ebenso war bei dieser applizierten 8-EOC-Menge ein schwacher Anstieg der SCE-Frequenz zu verzeichnen (Tabelle 6, Anstieg von $3,9 \pm 0,86$ auf $5,6 \pm 0,70$). 8-EOC führte also in vivo sowohl zu Chromosomenaberrationen als auch zur SCE-Bildung. Vergleicht man jedoch die induzierte SCE-Rate von 8-EOC mit den B(a)P-Werten (siehe 4.4), so läßt sich folgende Aussage machen:

Bei 8-EOC scheint die Sensitivität des SCE-Systems nicht größer als die der Analyse von Chromosomenaberrationen zu sein, denn während B(a)P den Anteil aberranter Metaphasen von 0,36 auf 0,86% exclusive Gaps steigert und die SCE-Rate von 4 auf 11 zunimmt, erfolgt im Fall von 8-EOC bei entsprechender Steigerung der Aberrationsrate nur eine Zunahme der SCE-Frequenz von 4 auf 6. Offensichtlich besitzt 8-EOC nicht die Fähigkeit, SCE und Chromosomenaberrationen in gleicher Stärke zu induzieren.

Tabelle 5:

Anstieg struktureller Chromosomenaberrationen in Knochenmarkszellen des Chinesischen Hamsters nach intraperitonealer Applikation von 8 - Äthoxycoffein. Die Applikation erfolgte zweimal im Abstand von 24 Stunden.

8-Äthoxy- coffein mg/kg	n Tiere	n Meta- phasen	n Metaphasen mit				% aberranter Metaphasen	
			Gaps	Brüche, Fragmente	Deletionen	Exchanges	incl. Gaps	excl. Gaps
0	7	1400	32	5	0	0	2,63	0,40
2 x 50	3	600	6	2	0	0	1,33	0,33
2 x 100	3	600	12	4	0	0	2,70	0,67
2 x 200	3	600	16	6	1	0	3,83	1,16 ⁺

+ $P \leq 0,05$

Tabelle 6:

SCE - Erhöhung durch 8 - Äthoxycoffein in Knochenmarkszellen des Chinesischen Hamsters. Die Tiere erhielten die Substanz, gelöst in Tricaprylin, zweimal im Abstand von 24 Stunden.

8-Äthoxy- coffein mg/kg	n Tiere	n Meta- phasen	SCE/Metaphase
0	8	400	$3,9 \pm 0,86$
2 x 50	3	130	$3,7 \pm 0,32$
2 x 100	3	130	$3,5 \pm 0,46$
2 x 200	3	150	$5,6 \pm 0,70^+$

+ $P \leq 0,01$

4.1.4 SCE-Erhöhung durch die polycyclischen Kohlenwasserstoffe Anthracen, Benz(a)pyren, Benz(e)pyren und Benz(b)fluoranthren.

Die polycyclischen Kohlenwasserstoffe Anthracen, Benz(a)pyren, Benz(e)pyren und Benz(b)fluoranthren wurden im SCE-Test auf ihre Mutagenität hin überprüft und die erzielten Ergebnisse mit denen anderer Testsysteme verglichen.

Da die in der Umwelt vorkommenden polycyclischen Kohlenwasserstoffe vorwiegend über den Magen-Darm-Trakt aufgenommen werden, erhielten Chinesische Hamster zunächst 2×450 mg/kg Körpergewicht im Abstand von 24 Stunden oral per Schlundsonde. Dazu wurden die Testsubstanzen Anthracen und Benz(a)pyren wie in 3.3 beschrieben in Gummi arabicum suspendiert. Die SCE-Rate pro Metaphase betrug in den Kontrollen $4,47 \pm 0,71$. Weder die Applikation von Anthracen ($4,64 \pm 0,36$) noch die von Benz(a)pyren ($4,71 \pm 1,07$) führte zu einer SCE-Erhöhung (Tabelle 7). Da die mutagene Wirkung von Benz(a)pyren aber bereits in anderen Verfahren nachgewiesen wurde (McCann et al 1975, Huberman et al 1971), war dieses Ergebnis zu überprüfen. Aufgrund dessen wurde in weiteren Versuchsreihen die Auswirkung des zur Suspendierung benutzten Lösungsmittels näher untersucht. Dazu wurde Benz(a)pyren in Tricaprylin suspendiert und wie in den ersten Versuchen oral per Schlundsonde verabreicht. Während in der Kontrolle die SCE-Rate $4,43 \pm 1,5$ betrug, stieg diese in den Knochenmarkszellen der Versuchstiere auf $8,6 \pm 1,2$ an (Tabelle 8). Demnach erfolgt die Verteilung der polycyclischen Kohlenwasserstoffe im Organismus besser, wenn diese in Tricaprylin suspendiert werden.

Da bei der Suspendierung in Tricaprylin und der oralen Applikation der Testsubstanz die Mortalität der Tiere sehr hoch war, wurden in einer dritten Versuchsreihe die Testsubstanzen zwar in Tricaprylin suspendiert, aber intraperitoneal appliziert. In dieser Weise verabreicht, führte Tricaprylin nicht

zu einer erhöhten Mortalität der Tiere, so daß die vier polycyclischen Kohlenwasserstoffe unter diesen Bedingungen getestet werden konnten. In jeder Versuchsgruppe wurden 400 Metaphasen von 8 Tieren (4 ♂ und 4 ♀) analysiert (Tabelle 9). Für die Kontrollgruppe ergab sich eine SCE-Rate von $3,9 \pm 0,86$ SCE/Metaphase. Anthracen erhöhte die SCE-Rate nicht ($3,6 \pm 0,76$), während Benz(b)fluoranthren die Rate auf $5,6 \pm 0,46$ und Benz(e)pyren auf $5,5 \pm 0,65$ SCE/Metaphase steigerte. Das stärkste Mutagen dieser Testreihe war Benz(a)pyren, hier fand eine SCE-Induktion auf $10,6 \pm 1,6$ statt.

Tabelle 7:

SCE- Erhöhung in Knochenmarkszellen des Chinesischen Hamsters nach oraler Applikation von Anthracen und Benz(a)pyren. Die Suspendierung der Testsubstanzen erfolgte in Gummi arabicum.

Substanz 2 x 450 mg/kg	n Tiere	n Meta- phasen	SCE/Metaphase	Signifikanz (t-Test)
-	10	500	4,47±0,71	-
Anthracen	6	300	4,64±0,36	-
Benz(a)pyren	8	400	4,71±1,07	-

Tabelle 8:

SCE- Erhöhung in Knochenmarkszellen des Chinesischen Hamsters nach oraler Applikation von Benz(a)pyren. Die Suspendierung der Substanz erfolgte in Tricaprylin.

Substanz 2 x 450 mg/kg	n Tiere	n Meta- phasen	SCE/Metaphase	Signifikanz (t-Test)
-	4	200	4,43±1,50	
Benz(a)pyren	4	200	8,60±1,20	+

+ $P \leq 0,01$

Tabelle 9:

SCE- Erhöhung in Knochenmarkszellen des Chinesischen Hamsters nach intraperitonealer Applikation polycyclischer Kohlenwasserstoffe. Die Suspendierung der Substanzen erfolgte in Tricaprylin.

Substanz 2x450 mg/kg	n Tiere	n Meta- phasen	SCE/Metaphase	Signifikanz (t-Test)
-	8	400	5,9 _± 0,86	
Anthracen	8	400	5,6 _± 0,76	-
Benz(b)- fluoranthen	8	400	5,6 _± 0,46	+
Benz(e)- pyren	8	400	5,5 _± 0,65	+
Benz(a)- pyren	8	400	10,6 _± 1,60	+

+ $P \leq 0,01$

4.1.5 Analyse struktureller Chromosomenaberrationen bei Applikation von Anthracen und Benz(a)pyren

Da die Analyse der Knochenmarkszellen auf Schwesterchromatidaustausche einerseits und strukturellen Chromosomenaberrationen andererseits zwar in verschiedenen Versuchsansätzen (die zur Analyse der Chromosomenaberrationen verwendeten Tiere erhielten kein BrdU und FrdU), aber zur gleichen Zeit erfolgte, wurden die Testsubstanzen in den ersten Untersuchungen wie bei der SCE-Analyse in Gummi arabicum suspendiert und oral per Schlundsonde verabreicht (Tabelle 10). Hierbei führten weder Anthracen noch Benz(a)pyren zu einer signifikanten Erhöhung der Aberrationsrate. Nach der Feststellung, daß die SCE-Frequenz bei Suspendierung der polycyclischen Kohlenwasserstoffe in Tricaprylin und intraperitonealer Applikation erhöht wird, wurde die Induktion struktureller Chromosomenaberrationen durch Anthracen und Benz(a)pyren auch unter diesen Bedingungen untersucht. Anthracen erhöhte in diesem System ebenfalls nicht den Anteil aberranter Metaphasen, während Benz(a)pyren die Aberrationsrate inklusive Gaps signifikant steigerte. Auch der zugehörige Wert exclusive Gaps lag mit 0,86 % deutlich oberhalb des Kontrollwertes, jedoch konnte hierbei im χ^2 -Test noch keine Signifikanz ermittelt werden.

Tabelle 10:

Analyse struktureller Chromosomenaberrationen in Knochenmarkszellen des Chinesischen Hamsters nach oraler bzw. intraperitonealer Applikation von Anthracen und Benz(a)pyren. Bei oraler Applikation erfolgte die Suspendierung der Substanz in Gummi arabicum, bei intraperitonealer Applikation in Triacetylin.
+ $P \leq 0,05$ i.p. = intraperitoneal

Substanz mg/kg	n Tiere	n Meta- phasen	n Metaphasen mit		Exchanges	% aberranter Metaphasen	
			Gaps	Brüche/Fragmente		incl. Gaps	excl. Gaps
- i.p.	7	1400	32	5	0	2,63	0,36
2x450 Benz(a)pyren i.p.	7	1400	68	8	4	5,71 ⁺	0,86
2x450 Anthracen i.p.	8	1600	62	4	0	4,13	0,25
- oral	7 5	1400 600	13 5	1 2	0 0	1,07 1,30	0,07 A 0,30
2x450 Benz(a)pyren oral	4	800	16	3	1	2,50	0,50
2x450 Anthracen oral	7	1400	7	2	0	0,64	0,14 A

4.2 In vitro Untersuchungen

4.2.1 Erhöhung der SCE-Frequenz und Zahl der strukturellen Chromosomenaberrationen bei Hemmung der Epoxid-Hydratase durch Cyclohexenoxid in einem in vitro Aktivierungssystem.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die mutagene Wirkung der polycyclischen Kohlenwasserstoffe in einem in vivo System überprüft, ohne auf die für die Mutagenität verantwortlichen Metabolite einzugehen. Polycyclische Kohlenwasserstoffe wie z.B. Benz(a)pyren werden wie in 2.3 beschrieben durch ein mikrosomales Enzymsystem in zwei Schritten metabolisiert: Monooxygenasen formen aus dem Promutagen verschiedene Epoxide, diese werden dann in einem weiteren Schritt durch die Epoxid-Hydratase in Dirole umgewandelt. Erste Untersuchungen (Grover et al 1972) an Chinesischen Hamsterzellen ließen vermuten, daß das K-Region 4,5-Epoxid von Benz(a)pyren der biologisch aktive Metabolit ist. Nachfolgende Versuche ließen jedoch eine mutagene Wirkung der nicht-K-Region-Dihydrodiole (Kalyani et al 1978) und Diol-Epoxide (Malaveille et al 1977, Thakker et al 1976) nicht ausschließen. Bei der Annahme, daß zumindest ein Teil der mutagenen Wirkung auf die gebildeten Epoxide zurückgeht, muß die biologische Aktivität von Benz(a)pyren bei Hemmung der Epoxid-Hydratase ansteigen. Die Umwandlung der Epoxide in die Dihydrodiole kann verhindert werden durch spezifische Epoxid-Hydratase-Inhibitoren. Die bisher bekannten wirkungsvollsten Enzyminhibitoren sind Cyclohexenoxid (CO) und 1,1,1-Trichlorpropen-2,3-oxid (TCPO, Oesch et al 1972, 1971a,b,c, 1973 a,b, 1977). Die Wirkung dieser Inhibitoren wurde mit Ausnahme der Untersuchungen von Callen und Tong-Man Ong (1978) an *Neurospora crassa* und *Saccharomyces cerevisiae* bisher ausschließlich in biochemischen Systemen überprüft. Daher ergab sich die Frage, ob die Mutagenität von Benz(a)pyren durch Hemmung der Epoxid-Hydratase in Säugerzellen zunimmt. Da weder TCPO noch CO in vivo wirksam ist (persönliche Mitteilung Oesch 1977), mußten diese Versuche mittels eines in vitro Systems durchgeführt werden. Dazu wurden Chinesische Hamsterzellen (Chinese hamster

ovary cells, CHO-Linie) mit Benz(a)pyren behandelt und zur Metabolisierung der Testsubstanzen S9-Mix (S9-Fraktion nach Ames und Cofaktoren) zugesetzt. Die Wirkung des Epoxid-Hydratase-Inhibitors CO wurde anhand derauf tretenden SCE und strukturellen Chromosomenaberrationen verfolgt.

4.2.1.1 Karyotyp der CHO-Zellen

Da bei etablierten Zelllinien eine Abänderung des Karyotyps eintreten kann, wurde dieser zunächst abgeklärt. Nach Giemsa-färbung der Chromosomen waren eine Reihe chromosomaler Veränderungen nachweisbar, die in Abbildung 20 wiedergegeben sind.

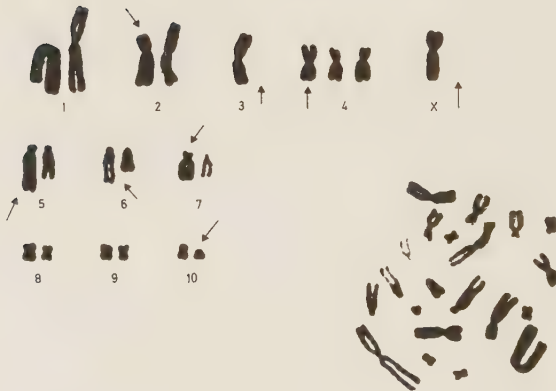


Abb. 20: Karyotyp der für die in vitro Versuche eingesetzten CHO-Linie (Chinese hamster ovary cells). Pfeile weisen auf chromosomale Veränderungen hin.

4.2.1.2 Wirkung des Epoxid-Hydratase-Inhibitors Cyclohexenoxid auf die SCE- und chromosomale Aberrationsrate

Die Wirkung des Epoxid-Hydratase-Inhibitors CO drückte sich in dem gewählten System in einer Erhöhung der SCE-Rate (Tabelle 11) bzw. in der Induktion von Chromosomenaberrationen aus (Tabelle 12). Kulturen, die nur DMSO erhielten (Tabelle 11, VN 1), wiesen $9,2 \pm 0,35$ SCE/Metaphase auf. Benz(a)pyren alleine erhöhte die SCE-Rate nicht (VN 2, $10,1 \pm 0,91$). Bei Zusatz des für die Metabolisierung notwendigen S9-Mix stieg die SCE-Rate auf $20,3 \pm 1,33$ (VN 10) an. Durch Hemmung der Epoxid-Hydratase nahm dieser Wert in Abhängigkeit von der CO-Konzentration weiter zu. Bei 1×10^{-5} M CO stieg die Frequenz auf $24,9 \pm 1,3$ (VN 11) und bei Verdopplung auf 2×10^{-5} M CO sogar auf $31,1 \pm 1,6$ SCE/Metaphase an (VN 12). Zu beachten ist allerdings, daß CO mit und ohne S9-Mix eine genetische Aktivität per se zeigte. Hier stieg die SCE-Rate auf $12,4 \pm 0,4$ (VN 2) und bei Erhöhung der CO-Konzentration auf 2×10^{-5} M (VN 3) sogar auf $15,3 \pm 0,5$ an. Die genetische Aktivität des Inhibitors per se wurde auch bei Zusatz von Leberhomogenat nicht reduziert (VN 7,8). Dies läßt vermuten, daß CO in Abwesenheit von Benz(a)pyren nicht an die Epoxid-Hydratase oder andere Proteine gebunden und inaktiviert wird.

Bei Behandlung der Kulturen mit Benz(a)pyren und CO ohne Zusatz von S9-Mix stieg die SCE-Rate auf $11,6 \pm 0,3$ (VN 4) bzw. $15,85 \pm 1,65$ (VN 5) an.

Tabelle 12 zeigt die Steigerung der strukturellen Chromosomenaberrationen bei Hemmung der Epoxid-Hydratase durch CO. In diesem System zeigte CO keine genetische Aktivität per se (VN 2,5). Bei Behandlung der Zellkulturen mit 10^{-5} M Benz(a)pyren (VN 9) lag die Aberrationsrate bei 11,5 % (inclusive Gaps) bzw. 3,0 % (exclusive Gaps). Diese stieg bei Zusatz von S9-Mix auf 20,5 bzw. 9,5% (VN 10) und bei Hemmung der Epoxid-Hydratase auf 34 und 12,5% (VN 11,12) an. Bei Verdopplung der CO-Menge auf 2×10^{-5} M nahm die Aberrationsrate - im Gegensatz zur SCE-Rate - nicht weiter zu.

Tabelle 11:

SCE - Erhöhung in Chinese hamster ovary cells durch Benz(a)pyren in An-oder Abwesenheit von Maus S9-Mix (post mitochondriale Fraktion nach Ames (1975) + Cofaktoren) und des Epoxid-Hydratase-Inhibitors Cyclohexenoxid. Es wurden zwei Versuchsreihen unter Benutzung der gleichen S9-Fraktion durchgeführt (Maus Phenobarbital induziert).

Versuchsnummer (VN)	Behandlung der Zellen mit	n Metaphasen	SCE/Metaphase
1	DMSO	100	9,20 $\pm$ 0,35
2	10 ⁻⁵ M CO	100	12,37 $\pm$ 0,35
3	2x10 ⁻⁵ M CO	70	15,30 $\pm$ 0,50
4	10 ⁻⁵ M B(a)P + 10 ⁻⁵ M CO	70	11,60 $\pm$ 0,30
5	10 ⁻⁵ M B(a)P + 2x10 ⁻⁵ M CO	95	15,85 $\pm$ 1,65
6	S9 + DMSO	100	9,40 $\pm$ 0,65
7	S9 + 10 ⁻⁵ M CO	100	12,00 $\pm$ 0,70
8	S9 + 2x10 ⁻⁵ M CO	70	16,20 $\pm$ 0,30
9	10 ⁻⁵ M B(a)P	70	10,10 $\pm$ 0,91
10	S9 + 10 ⁻⁵ M B(a)P	80	20,30 $\pm$ 0,91 ⁺
11	S9 + 10 ⁻⁵ M B(a)P + 10 ⁻⁵ M CO	70	24,90 $\pm$ 1,30
12	S9 + 10 ⁻⁵ M B(a)P + 2x10 ⁻⁵ M CO	70	31,10 $\pm$ 1,60 ⁺⁺

B(a)P = Benz(a)pyren

CO = Cyclohexenoxid

+ P $\leq$ 0,05 im Vergleich zu VN 9

++ P $\leq$ 0,05 im Vergleich zu VN 10

Tabelle 12:

Induktion struktureller Chromosomenaberrationen in Chinese hamster ovary cells durch Benz(a)pyren in An- oder Abwesenheit von Maus S9-Mix (post mitochondriale Fraktion nach Ames (1975) + Cofaktoren) und des Epoxid-Hydratase-Inhibitors Cyclohexenoxid. Es wurden zwei Versuchsreihen unter Benutzung der gleichen S9-Fraktion durchgeführt (Maus Phenobarbital induziert).

Versuchs- nummer	Behandlung der Zellen mit	n Meta- phasen	n Metaphasen mit			Deletio- nen	Exchanges	multiplen Aberrationen	% aberranter Metaphasen	
			Gaps	Brüche, Fragmente					incl.Gaps	excl.Gaps
1	DMSO	140	9	2	0	0	0	0	7,9	1,5
2	1x10 ⁻⁵ M C0	200	13	5	0	0	0	0	9,0	2,5
3	2x10 ⁻⁵ M C0	200	9	1	1	0	0	0	5,0	1,0
4	B(a)P + 1x10 ⁻⁵ M C0	200	12	5	1	1	1	0	9,5	3,5
5	B(a)P + 2x10 ⁻⁵ M C0	140	9	2	0	2	0	0	9,3	2,3
6	S9 + DMSO	140	6	3	0	0	0	0	6,5	2,2
7	S9 + 1x10 ⁻⁵ M C0	170	11	4	0	1	1	0	9,5	2,9
8	S9 + 2x10 ⁻⁵ M C0	200	15	4	0	1	1	0	10,0	2,5

Fortsetzung Tabelle 12

Versuchs- nummer	Behandlung der Zellen mit	n Meta- phasen	n Metaphasen mit				% aberranter Metaphasen	
			Gaps	Brüche, Fragmente	Deletio- nen	Exchanges	multiplen Aberrationen	incl.Gaps excl.Gaps
9	B(a)P	200	17	5	1	0	0	11,5
10	B(a)P + S9	200	22	17	0	0	2	20,5 ⁺
11	B(a)P + S9 + 1x10 ⁻⁵ M C0	200	43	21	2	2	0	34,0 ⁺⁺
12	B(a)P + S9 + 2x10 ⁻⁵ M C0	200	55	21	0	3	0	39,5 ⁺⁺
								12,5
								12,0

B(a)P = Benz(a)pyren 1 x 10⁻⁵M
C0 = Cyclohexenoxid
+ = P ≤ 0,05 bezogen auf VN 9
++ = P ≤ 0,05 bezogen auf VN 10

5. Diskussion

5.1 Sensitivität des SCE-Testes; Vor-und Nachteile dieser Methode

Der direkte Vergleich zweier cytogenetischer Testsysteme - der Nachweis von mutagen-induzierten SCE einerseits und strukturellen Chromosomenaberrationen andererseits - ergab eine etwa 10fach größere Sensitivität des SCE-Testes. Dabei konnte in beiden Testreihen eine klare Dosis-Effekt-Beziehung ermittelt werden; diese wiesen allerdings einen grundsätzlich verschiedenen Charakter auf. Eine signifikante Erhöhung der SCE-Frequenz pro Metaphase erfolgte bereits bei Applikation von 1,0 mg Cyclophosphamid pro kg Körpergewicht. In Abhängigkeit von der verabreichten Cyclophosphamidmenge nahm auch die SCE-Rate zu, jedoch trat bei 25,0 mg/kg die Kurve in ein Plateau über. Im Gegensatz dazu konnte eine signifikante Erhöhung der Metaphasen mit strukturellen Chromosomenaberrationen beiden niedrigen applizierten Substanzmengen nicht nachgewiesen werden. Erst bei Gabe von 13,3 mg/kg lag der Anteil aberranter Metaphasen deutlich über den Kontrollwerten; danach nahm dieser Anteil linear bis exponentiell mit der Cyclophosphamidkonzentration zu (da bei der Auswertung wie in 3.5.1 beschrieben nicht streng zwischen Ein- und Mehrtrefferereignissen unterschieden wurde, war ein eindeutig linearer oder exponentieller Kurvenverlauf auch nicht zu erwarten). Der Vergleich beider Dosis-Effekt-Beziehungen läßt folgendes erkennen:

- a. Eine signifikante Erhöhung der SCE-Rate zeigt sich bereits bei niedrigen Konzentrationen der applizierten Testsubstanz. Bei Vergleich der unteren effektiven Dosen ergibt sich somit eine etwa 10fach größere Sensitivität des SCE-Verfahrens.
- b. Es besteht eine enge Korrelation zwischen der Induktion von strukturellen Chromosomenaberrationen und SCE. Diese ist zumindest für Cyclophosphamid gültig.
- c. Um die Sensitivität beider Testsysteme gegeneinander abzugrenzen, muß eine Dosis-Effekt-Beziehung aufgestellt werden.

d. Während die Zahl der Metaphasen mit strukturellen Chromosomenaberrationen entsprechend dem Kurvenverlauf zumindest theoretisch auf 100 % ansteigen kann, steuert die SCE-Rate auf einen Sättigungswert zu, der um 30 SCE/Metaphase zu liegen scheint.

Der Nachweis der mutagenen Wirkung des Cyclophosphamids gelang auch bei Vergleich mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen in anderen Testsystemen (Matter und Grauwiler 1974, Goetz et al 1975) im SCE-Test in äußerst niedrigen Konzentrationsbereichen. Goetz et al bestimmten die untere effektive Dosis für einen signifikanten Anstieg von Mikrokernen und Chromosomenaberrationen mit 10,0 mg/kg im Chinesischen Hamster und 5,0 mg/kg Körpergewicht in der Maus. Dagegen geben Matter und Grauwiler als Mindestdosis für den Mikrokernnachweis in der Maus 19,0 mg/kg an, so daß es aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse nicht möglich ist, die untere effektive Dosis für dieses Testsystem eindeutig festzulegen. Bauknecht et al (1977) bestimmten die Mindestdosis für einen signifikanten Anstieg der SCE-Rate in der Maus mit 0,1 mg/kg, für den Chinesischen Hamster kann nach eigenen Untersuchungen 1,0 mg/kg angegeben werden. Allerdings wird von Bauknecht et al die Veränderung der SCE-Rate von $4,1 \pm 0,5$ auf $5,1 \pm 0,5$ bereits als positiv bewertet. Dieser Unterschied kann aber nicht als gesichert angenommen werden, da pro Dosis jeweils nur zwei männliche Tiere und insgesamt nur 40 Metaphasen analysiert wurden. Vermutlich ist auch hier die untere wirksame Dosis mit 1,0 mg/kg Körpergewicht anzunehmen. Daraus ergibt sich hinsichtlich der Sensitivität der drei Testsysteme folgende Rangordnung:

SCE $\rangle$ strukturelle Chromosomenaberrationen $\rangle$ Mikronuclei

Tabelle 13:

Vergleich der unteren effektiven Dosen für Cyclophosphamid in drei verschiedenen cytogenetischen Testsystemen.

Testsystem	untere effektive Dosis mg/kg	Literaturzitat
Mikronucleus	19 (Maus CD Albino)	Matter und Grauwiler 1974
	5 (Maus ICR)	Goetz et al 1975
	5 (Ratte Wistar)	Goetz et al 1975
	10 (Chinesischer Hamster)	Goetz et al 1975
SCE	0,1 (Maus NMRI und andere)	Bauknecht et al 1977
	1,0 (Chinesischer Hamster)	eigene Unter- suchungen
Chromosomen- aberrationen	5 (Maus ICR)	Goetz et al 1975
	5 (Ratte Wistar)	Goetz et al 1975
	10 (Chinesischer hamster)	Goetz et al 1975
	10 (Chinesischer Hamster)	eigene Unter- suchungen

... als Katalysator für die Bildung von Chromosomenaberrationen bei Verwendung von Prostaglandin als Versuchssubstanz. Jedoch bleibt abzuwarten, ob diese generalisierbarer Natur ist. Sollten zwei verschiedene Mechanismen für die Bildung von Chromosomenaberrationen führen, so ist die Existenz chemischer Agenzien nicht auszuschließen. Die entweder zur NH_2 -oder chromosomale Aberrationsrate schaden. Einem Hinweis auf derartige chemische Substanzen liefern die Untersuchungen von Kallman (1977). In seinen Untersuchungen wurde festgestellt, daß bei einer Verdünnung der NH_2 -Progenen wohl aber zur Erhöhung der Anzahl Metaphasen mit Chromosomenaberrationen. In diese Versuche an Vicia faba durchgeführt wurden, umgeben die Verdünnung der Verdünnung von NH_2 -Progenen zu einer Verdünnung von NH_2 -Progenen. Hierbei konnte keine Dosis-Effekt-Beziehung ermittelt werden. Die zweifache Gabe von 10^{-4} mg/kg Körpergewicht führte in beiden Fällen zu einer signifikanten Steigerung der Metaphasen, so daß normalerweise Hinweis für die Existenz zweier verschiedener Mechanismen - der eine führt zur NH_2 -Bildung, der andere zu Chromosomenaberrationen - aus den Ergebnissen ableitbar sind.

Die NH_2 -Rate von ist höher als mit der NH_2 -Rate oder Spontanzrate. NH_2 -Progenen führt zu Sekundärmutationen und kann somit NH_2 herbeiführen. Dies, jedoch, der Empfindlichkeit der NH_2 -Rate für die in und kann ebenfalls zur NH_2 -Bildung beitragen. Daraus resultiert die Frage nach der Existenz einer Spontanzrate, da eine Nullgutmessung nicht möglich ist. Sowohl die in vitro Untersuchungen von Late (1974) als auch die in vivo von Rice et al (1976) zeigten eine Abhängigkeit der Existenz einer Spontanzrate auf. Beide Autoren wiesen für die Abhängigkeit der NH_2 -Rate von der zugeführten Dosis-Konzentration einen Schwellenwert nach. Dagegen stellt die Arbeit von Perry und Wolff (1974) das Vorhandensein einer Spontanzrate in Frage. Da es den Autoren nicht möglich war, bei niedrigen Dosis-Konzentrationen die Existenz einer Spontanzrate bezüglich der NH_2 -Progenen nachzuweisen. Bei der zugeführten Dosis-Konzentration, wie sie in der beschriebenen in vitro Versuchen erfolgte, variierte die NH_2 -Rate im Bereich

20-30 $\mu\text{g/g/h}$ nicht. Dies läßt vermuten, daß entweder schon der obere Sättigungswert der Kurve oder aber der Schwellenwert noch nicht erreicht war. Da die visuelle Analyse der SCE bei Applikation von 20 $\mu\text{g/g/h}$ sich als äußerst schwierig erwies, trifft wohl die letzte Deutung zu.

Die zur Analyse der SCE erforderliche BrdU-Applikation wirft neben der Frage nach der Spontanrate noch ein weiteres Problem auf. BrdU ist als Sensibilisator für die chromosomenschädigende Wirkung von Röntgenstrahlen bekannt (Rieger und Michaelis 1967). Die erhöhte Sensitivität des SCE-Systems könnte daher auch auf eine synergistische Wirkung zwischen BrdU und der Testsubstanz zurückzuführen sein, insbesondere, da weitreichende Veränderungen des Zellmetabolismus durch BrdU-Einbau beschrieben wurden (Hill et al 1974, Lowry et al 1971). Die mehrfache BrdU-Applikation führt nicht nur zu einer physiko-chemischen Modifikation der DNA, sondern auch zu zellulären, funktionellen und metabolischen Veränderungen im Tier. Obwohl das Desoxyderivat selbst nicht in RNA eingebaut wird, stellten Hill et al (1974) eine Veränderung der Basenzusammensetzung der zellulären RNA nach Wachstum in BrdU fest. Sowohl in vitro als auch in vivo nimmt der Guaningehalt der gebildeten RNA zu, während der Adeningehalt sinkt. Andere Autoren berichteten über die Unterbindung der Expression differenzierter Funktionen (Stockdale et al 1964), die Induktion latenter Viren sowie über die selektive Inhibierung der Genexpression für spezifische Milchproteine nach BrdU-Inkorporation (Lowry et al 1971). Die Auswirkungen von BrdU auf den Zellmetabolismus sind demnach vielfältig und es ergibt sich die Frage, inwieweit Veränderungen der Chromosomenstruktur und der SCE-Rate bei gleichzeitiger Gabe der Testsubstanz auf den Einbau des Thymidinanalogs zurückzuführen sind. Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche vermögen hierauf keine Antwort zu geben, so daß die Problematik der SCE-Methode bei der Planung und Bewertung weiterer Versuche immer im Auge behalten werden sollte.

Ferner könnte die Wahl des Applikationszeitpunktes der Testsubstanz noch von Bedeutung sein. Substanzen, die langsam metabolisiert werden, sollten frühzeitig (d.h. mit der ersten BrdU-Gabe) verabreicht werden, damit der aktive Metabolit den Zellen nach dem zweiten Replikationszyklus zur Verfügung steht. Bei Substanzen mit sehr kurzer Halbwertszeit dagegen muß die Applikation später erfolgen. Bei unbekannten Testsubstanzen müssen diese Parameter in Vorversuchen abgeklärt werden.

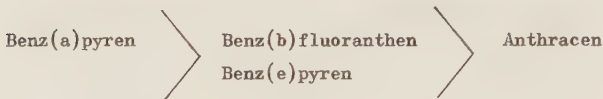
Letztlich bleibt noch zu entscheiden, ab wann eine Steigerung der SCE-Rate als biologisch relevant zu bezeichnen ist. Bei Anwendung des t-Testes zur Signifikanzberechnung werden bereits positive Resultate unterhalb des Steigerungsfaktor zwei erhalten. Der Vergleich mit anderen Testsystemen legt allerdings die Forderung nahe, für biologisch relevante Ergebnisse mindestens eine Verdopplung der Kontrollwerte vorauszusetzen. Diese Forderung als Basis biologischer Relevanz wird heute in der Mutationsforschung allgemein vertreten, obwohl sie gelegentlich im Widerstreit zur Statistik steht.

Der SCE-Test erfordert eine langwierige Behandlung der Tiere sowie eine aufwendige Färbung der Präparate. Der Vorteil dieses Systems liegt daher nicht in der Methodik, da andere cytogenetische Testsysteme (z.B. Mikronucleusanalyse) schneller und problemloser durchgeführt werden können, sondern nach den bisherigen Erfahrungen in der hohen Sensitivität des SCE-Systems.

5.2 Mutagenität polycyclischer Kohlenwasserstoffe

Die mutagene Potenz der polycyclischen Kohlenwasserstoffe wurde durch Analyse der SCE-Erhöhung bestimmt. Hierbei zeigte Anthracen keine, Benz(b)fluoranthren und Benz(e)pyren eine schwache und Benz(a)pyren eine starke Aktivität. Benz(b)fluoranthren und Benz(e)pyren erhöhten die SCE-Rate von 5,9 (Kontrolle) auf 5,6, Benz(a)pyren auf 10,6 SCE/Metaphase. Die erzielten SCE-Werte für Benz(a)pyren korrelieren mit den Ergebnissen von Bayer und Bauknecht (1977). Die Autoren beobachteten bei Applikation von 100 mg/kg Körpergewicht eine Erhöhung der SCE-Rate von 5,4 auf 8,5. Bei den hier beschriebenen Versuchen wurde die Dosis mehr als vervierfacht, dabei stieg die SCE-Frequenz aber nur noch um zwei pro Metaphase an. Unter Einbezug der Ergebnisse von Bayer und Bauknecht ergibt sich somit für die Dosis-Effekt-Beziehung von Benz(a)pyren eine Sättigungskurve. Vergleicht man die durch die polycyclischen Kohlenwasserstoffe verursachte SCE-Steigerung mit der des Cyclophosphamids, so wird deutlich, daß der Aktivitätsgrad der getesteten Kohlenwasserstoffe um ein vielfaches geringer ist. Dies zeigte sich auch bei Analyse der im Knochenmark nachweisbaren Chromosomenaberrationen. Nach intraperitonealer Benz(a)pyren-Applikation traten nur wenige Austauschfiguren auf, während bei Cyclophosphamidgabe dieser Aberrationstyp einen beachtlichen Prozentsatz ausmachte. Ferner ist zu vermerken, daß eine Steigerung der SCE-Rate und der Anzahl struktureller Chromosomenaberrationen im Fall von Benz(a)pyren nur bei Suspensierung in Tricaprylin, nicht aber in Gummi arabicum erfolgte. Offenbar ist die Verteilung und/oder Metabolisierung der polycyclischen Kohlenwasserstoffe im Organismus nur bei Suspensierung in Tricaprylin gewährleistet. Konkrete Angaben können hierzu nicht gemacht werden. Ebenso ist nicht bekannt, warum bei oraler Applikation Tricaprylin eine große Toxizität zeigt.

Für die mutagene Potenz der vier getesteten polycyclischen Kohlenwasserstoffe kann folgende Rangordnung angegeben werden:



Die gleiche Reihenfolge ergibt sich auch bei Vergleich dieser Werte mit der Mutagenität im Salmonella/Mikrosomen Test (Mc Cann et al 1975) und mit dem Cancerogenitätsindex nach Iball¹ (Arcos und Argus 1968).

Tabelle 14: Vergleich der Mutagenität/Cancerogenität der polycyclischen Kohlenwasserstoffe Anthracen (A), Benz(e)-pyren [B(e)P], Benz(a)pyren [B(a)P] und Benz(b)fluoranthren [B(b)F]

Substanz	Cancerogenität (Iball-Index)	Mutagenität Salmonella/ Mikrosomen Test	SCE-Test	Erhöhung struktureller Chromosomenab- errationen
B(a)P	>70 ++	++	++	(+)
B(b)F	<70 +	+ ^o	+	n.t.
B(e)P	< 5 (+)	+ ^o	+	n.t.
A	< 2 -	-	-	-

++ stark mutagen/cancerogen

+ mutagen/cancerogen

(+) schwach mutagen/cancerogen

- nicht mutagen/cancerogen

o Stobel, persönliche Mitteilung 1978 (Institut für Human-genetik und Anthropologie, Universität Düsseldorf)

¹ Iball-Index = $\frac{\% \text{ Tiere mit Tumoren} \times 100}{\text{durchschnittliche Latenzzeit}}$

Anthracen zeigt in allen Testverfahren weder eine mutagene noch cancerogene Aktivität. Benz(e)pyren und Benz(b)fluoranthren sind etwa gleich aktiv in den die Mutagenität verifizierenden Systemen, wobei allerdings die Mutagenitätsstärke des Benz(b)fluoranthren unterhalb der durch den Iball-Index zu erwartenden Aktivität liegt. Hier stimmen Cancergenität und Mutagenität zwar qualitativ, nicht aber quantitativ überein. Benz(a)pyren weist von allen bisher getesteten polycyclischen Kohlenwasserstoffen den höchsten Iball-Index auf und zeigt auch in allen Testverfahren die größte mutagene Potenz.

5.5 Hemmung der Epoxid-Hydratase in vitro

Die durch Hemmung der Epoxid-Hydratase erzielte Steigerung der SCE-Rate bzw. der strukturellen Chromosomenaberrationen war um einiges geringer als erwartet. Nur bei der SCE-Analyse kam es zu einer, von der Inhibitor-Konzentration abhängigen Steigerung der Benz(a)pyren-Mutagenität. Dagegen stieg der Anteil aberranter Metaphasen nur inclusive Gaps signifikant an und ließ auch keine Abhängigkeit von der InhibitorKonzentration erkennen. Da nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen (Brecher 1977) achromatische Lücken in den Chromatiden zum Teil Brüche darstellen, sowie ein Teil der im Lichtmikroskop als Bruch identifizierten Strukturveränderungen noch Chromatidenbrücken aufweisen, ist der Anstieg von 20,5 auf 39 % aberranter Metaphasen bei Hemmung der Epoxid-Hydratase durch Cyclohexenoxid als sicheres Zeichen für eine Steigerung der Mutagenität zu bewerten. Im Hinblick auf die unterschiedliche Sensitivität beider Testsysteme, die an der Dosis-Effekt-Beziehung für Cyclophosphamid eingehend diskutiert wurde, lieferten beide Versuchsansätze qualitativ äquivalente Ergebnisse, so daß folgende Aussage gemacht werden kann:

- a. Im SCE-Test zeigt Cyclohexenoxid eine genetische Aktivität per se. Diese wird durch Zusatz von S9-Mix nicht eliminiert. Offensichtlich wird der Inhibitor nicht durch Proteine innerhalb der Inkubationslösung inaktiviert, somit findet auch vermutlich in Abwesenheit von Benz(a)pyren und dessen Metabolite keine Bindung an die Epoxid-Hydratase selbst statt.
- b. Die Behandlung der Kulturen mit Benz(a)pyren, Cyclohexenoxid und S9-Mix führt zu einer von der InhibitorKonzentration abhängigen Steigerung der SCE-Rate. Diese liegt allerdings höher als durch die Wirkung von Cyclohexenoxid alleine zu erwarten wäre. Vermutlich ist ein Teil der nachweisbaren SCE auf die genetische Aktivität per se und ein anderer Teil auf eine Inhibierung der Epoxid-Hydratase zurückzuführen. In

diesem Fall könnte Cyclohexenoxid erst an das Enzym nach Bindung des Benz(a)pyren-Metaboliten binden (Bindung nur an ES-Komplex $\rightarrow$ ESI), so daß Cyclohexenoxid zunächst genetisch aktiv sein würde. Erste Hinweise auf einen derartigen Mechanismus finden sich bei Oesch et al (1971a). Die Autoren stellten bei Inkubation des Enzyms mit dem Inhibitor keine Steigerung der Hemmung fest.

- c. Benz(a)pyren zeigt ohne Metabolisierung keine mutagene Wirkung.
- d. Bei der Analyse der strukturellen Chromosomenaberrationen zeigt Cyclohexenoxid keine genetische Aktivität per se. In allen Kontrollkulturen ist keine Erhöhung der Aberrationsrate zu verzeichnen. Benz(a)pyren erweist sich auch in vitro als nicht stark mutagen. Lediglich Brüche, Fragmente und Gaps werden induziert, aber keine Austauschfiguren.

Die relativ geringfügige Steigerung der Mutagenität bei Anwendung eines Epoxid-Hydratase-Inhibitors kann auf verschiedene Parameter zurückgeführt werden. Benz(a)pyren wird enzymatisch durch die Monooxygenase in Epoxide umgewandelt. Diese Epoxidierung kann an der als K-Region bekannten 4,5-Bindung, aber auch in der 7,8- oder 9,10-Position erfolgen. Durch Hemmung der Epoxid-Hydratase wird die enzymatische Umwandlung der Epoxide in die Dihydrodiole weitgehend verhindert. Allerdings können die gebildeten Epoxide noch auf nicht-enzymatischen Wegen oder durch Konjugation mit Glutathion-Transferasen einer Reaktion mit dem Chromatin des Zellkerns entzogen werden. Weiter ist nicht auszuschließen, daß andere bisher nicht gut definierte Komponenten im Cytosol der Zellen, wie z.B. das h-Protein (Sarrif et al 1978), polycyclische Kohlenwasserstoffe und ihre Metabolite aktiv binden. Eine Erklärung für die relativ geringe Erhöhung der mutagenen Wirkung von Benz(a)pyren bei Hemmung der Epoxid-Hydratase wäre demnach die Inaktivierung der biologisch wirksamen Metabolite über andere Stoffwechselwege. Bei Sättigung der Kapazität dieser Systeme träte dann allerdings auch eine Steigerung der Mutagenität ein.

Bei der Annahme, daß die biologisch wirksamsten Benz(a)pyren-Metabolite bei Hemmung der Epoxid-Hydratase nicht gebildet

werden, kann eine weitere Erklärung für die geringe Mutagenitätssteigerung gegeben werden. Sind z.B. Diol-Epoxide die aktivsten Metabolite, so können diese bei Inhibierung der Epoxid-Hydratase nur in geringem Ausmaß über nicht-enzymatische Diolbildung entstehen. Verschiedene Studien (Newbold und Brookes 1976, Malaveille et al 1977, Sims et al 1974) lassen in der Tat vermuten, daß das 7,8-Diol-9,10-Epoxid von Benz(a)pyren der aktivste Metabolit unter den bisher bekannten ist. Nach Wislocki et al (1976) ist dieser Diol-Epoxid in *Salmonella typhimurium* TA 98 und TA 100 5-20 mal mutagener als das Benz(a)pyren-4,5-Epoxid. Zum qualitativ gleichen Ergebnis kamen auch Newbold und Brookes (1976) sowie Huberman et al (1976) bei Versuchen mit Chinesischen Hamsterzellen, so daß eine größere Aktivität der Diol-Epoxide im Vergleich zu den K-Region-Epoxiden angenommen werden kann. Möglicherweise stellen die Diol-Epoxide ein schlechtes Substrat für die Epoxid-Hydratase oder Glutathion-Transferase dar (Sims et al 1974), so daß die genetische Aktivität länger erhalten bleibt.

King et al (1975) analysierten die Bindung von Benz(a)pyren an DNA bei Metabolisierung durch Rattenlebermikrosomen mittels Sephadex LI 20 Säulenchromatographie. Unter diesen Bedingungen waren fünf an DNA bindende Fraktionen nachzuweisen. Bei Hemmung der Epoxid-Hydratase durch Cyclohexenoxid oder Trichlorpropenoxid nahm die Bindung an DNA um 20-30 % zu. Dabei ging ein Bindungsprodukt verloren, während die Menge eines anderen deutlich zunahm. Dies läßt vermuten, daß es sich beim ersteren um Dihydrodirole oder Diol-Epoxide und beim anderen um Benz(a)pyren-Epoxide handelte. Da das bei Hemmung der Epoxid-Hydratase zunehmende Bindungsprodukt identisch mit Benz(a)pyren-K-Region-DNA-Komplexen war, scheint die Hemmung der Epoxid-Hydratase, wie erwartet, zu einer vermehrten Bildung von Benz(a)pyren-Epoxiden und zwar besonders der K-Region-Epoxide zu führen. Die bei King et al erzielte Bindungssteigerung der Benz(a)pyren-Metabolite an DNA

um 20-30 % bei Hemmung der Epoxid-Hydratase entspricht etwa der Steigerungsrate bei den SCE-Versuchen. Die SCE-Rate stieg bei Anwendung des Epoxid-Hydratase-Inhibitors Cyclohexenoxid um 20-30 % an, so daß diese Erhöhung wahrscheinlich auf das längere und vermehrte Auftreten von K-Region-Epoxiden des Benz(a)pyrens zurückzuführen ist.

Ferner besteht noch die Möglichkeit, daß die Hemmwirkung der genannten Epoxid-Hydratase-Inhibitoren innerhalb der Gruppe der Nager verschieden ist. Callen und Tong-Man Ong (1977) setzten Leberhomogenat vom Hamster (Phenobarbital induziert) zur Metabolisierung der Testsubstanz ein und fanden einen 50fachen Anstieg der Mutationsrate bei Hemmung der Epoxid-Hydratase. In den hier beschriebenen Versuchen wurde stattdessen die S9-Fraktion von Mäusen (NMRI, Phenobarbital induziert) gewonnen. Ob derartig große Unterschiede innerhalb der Nager bei der Reaktion der Epoxid-Hydratase auf spezifische Inhibitoren zu erwarten sind, wurde bisher noch nicht untersucht. Außerdem verwendeten Callen und Tong-Man Ong als Testsubstanz nicht Benz(a)pyren sondern Aflatoxin B₁, Trichlorpropenoxid statt Cyclohexenoxid, sowie *Neurospora crassa* und *Saccharomyces cerevisiae* als Testorganismen, so daß die Resultate beider Versuchsansätze nicht unmittelbar miteinander verglichen werden können.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die cancerogene/mutagene Wirkung von Benz(a)pyren nicht auf die Existenz eines Metaboliten, sondern auf ein Zusammenspiel mehrerer Benz(a)pyren-Produkte zurückzuführen ist.

5.4 Antworten auf die Problemstellung

In der Einleitung wurde die Problemstellung in drei Punkte unterteilt, auf die nun in wenigen Sätzen eine Antwort gegeben werden kann:

- a. Der Vergleich zweier cytogenetischer, die Mutagenität chemischer Agenzien messende Testverfahren (SCE, Chromosomenaberrationen) ergab eine 10 fach größere Sensitivität des SCE-Tests.
- b. Von den vier getesteten polycyclischen Kohlenwasserstoffen erwies sich Benz(a)pyren als eindeutig mutagen, Benz(b)fluoranthren und Benz(e)pyren sind nur schwach mutagen. Anthracen zeigt keinerlei mutagene Potenz.
- c. Die Rolle der Benz(a)pyren-Epoxide bei der Mutationsauslösung konnte durch den beschriebenen Versuchsansatz nicht geklärt werden. Es scheint aber, daß die mutagene Potenz der Benz(a)pyren-Epoxide bisher im allgemeinen überschätzt wurde.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei cytogenetische Testverfahren zur Messung der mutagenen Potenz chemischer Agenzien angewendet. Die Sensitivität beider Testmethoden - der Nachweis mutagen-induzierter Schwesterchromatidaustausche (SCE) einerseits und struktureller Chromosomenaberrationen andererseits - wurde zunächst anhand einer als mutagen bekannten Substanz gegeneinander abgegrenzt. Hierbei erhielten Chinesische Hamster Cyclophosphamid in fünf verschiedenen Dosen. In beiden Testverfahren konnte eine klare Dosis-Effekt-Beziehung ermittelt werden; jedoch zeigen beide Kurven einen grundsätzlich verschiedenen Charakter. Eine Erhöhung der SCE-Frequenz pro Metaphase setzte schon bei niedrigen applizierten Dosen ein, bei höheren Konzentrationen ging die Kurve in ein Plateau über. Dagegen traten strukturelle Chromosomenaberrationen bei den unteren Dosen noch nicht auf. Erst mit Applikation von 13,0 mg/kg Körpergewicht stieg der Anteil aberranter Metaphasen signifikant an. Die untere effektive Dosis kann somit im SCE-Test mit 1,0 mg/kg und bei Analyse struktureller Chromosomenaberrationen mit ca. 10,0 mg/kg Cyclophosphamid angegeben werden. Daraus ergibt sich eine 10 fach größere Sensitivität des SCE-Tests.

Ferner wurden die polycyclischen Kohlenwasserstoffe Anthracen, Benz(e)pyren, Benz(b)fluoranthen und Benz(a)pyren in diesen Testverfahren auf ihre Mutagenität hin überprüft. Dabei wurde Chinesischen Hamstern die Testsubstanz oral per Schlundsonde oder intraperitoneal verabreicht und die Erhöhung der SCE-Rate sowie das Auftreten von strukturellen Chromosomenaberrationen wie Gaps, Brüchen, Fragmenten, Deletionen und Austauschfiguren mittels Analyse der Knochenmarkszellen verfolgt. In diesen Untersuchungen erwies sich Anthracen als nicht mutagen, Benz(e)pyren und Benz(b)fluoranthen als schwach mutagen. Das stärkste Mutagen dieser Reihe war zweifellos Benz(a)pyren; hierbei wurde die SCE-Frequenz pro Metaphase mehr als verdoppelt. Die im SCE-Test ermittelte Mutagenitätsstärke korreliert bis auf die Werte für Benz(b)fluoranthen mit der cancerogenen Potenz (Iball-Index), so daß hinsichtlich der Mutagenitätsstärke die Reihenfolge Benz(a)pyren > Benz(b)fluoranthen, Benz(e)pyren > Anthracen gültig ist.

Im zweiten Teil der Arbeit schließlich wurde die mutagene Wirkung von Benz(a)pyren bei Inhibierung der Epoxid-Hydratase durch Cyclohexenoxid in einem in vitro Aktivierungssystem untersucht. Bei Hemmung der Epoxid-Hydratase nahm die Zahl der Benz(a)pyren-induzierten Schwesterchromatidaustausche in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration um 20-50 % zu. Auch der Anteil aberranter Metaphasen vergrößerte sich unter diesen Bedingungen. Jedoch war die erzielte Mutagenitätssteigerung in beiden Fällen geringer als erwartet. Dies läßt vermuten, daß die mutagene Potenz der durch Metabolisierung entstehenden Benz(a)pyren-Epoxide bisher stark überschätzt wurde.

Literaturverzeichnis

- Ames, B.N., J. Mc Cann und E. Yamasaki, Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutation Research 31 (1975) 347-363
- Arcos, J.C und M.F. Argus, Molecular geometry and carcinogenic activity of aromatic compounds. New perspectives. Adv. Cancer Research 11 (1968) 305-471
- Badger, G.M., The carcinogenic hydrocarbons: chemical constitution and carcinogenic activity. British J. Cancer 11 (1948) 310-349
- Bauknecht, Th., W. Vogel, U. Bayer und D. Wild, Comparative in vivo mutagenicity testing by SCE and micro-nucleus in mouse bone marrow. Hum. Genet. 35 (1977) 299-307
- Bayer, U. und Th. Bauknecht, The dose-dependence of sister chromatid exchanges induced by 3 hydrocarbons in the in vivo bone marrow test with Chinese hamsters. Experientia 33 (1977) 25
- Brecher, St., Ultrastructural observations of X-ray induced chromatid gaps. Mutation Research 42 (1977) 249-268
- Brodie, B.B., W.D. Reid, A.K. Cho, G. Sipes, G. Krishna und J.R. Gillette, Possible mechanism of liver necrosis caused by aromatic organic compounds. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68 (1971) 160
- Callen, D.F. und Ong Tong-Man, Effects of the epoxide hydrase inhibitor 1,1,1-trichloropropane-2,3-oxide on the genetic activity of Aflatoxin B₁ metabolites in an in vitro activation test system. Mutation Research 49 (1978) 371-376

- Mc Cann, J., E. Choi, E. Yamasaki und B.N. Ames, Detection of carcinogens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 (1975) 5135-5139
- Clar, E., Polycyclic Hydrocarbons
Academic Press New York, London
Vol. 1 und 2, Springer Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg 1964
- Comings, D.E., Mechanisms of chromosome banding Hoechst 35 258 -DNA interaction.
Chromosoma 52 (1975) 229-243
- Cornish, H.H. und A.A. Christman, A study of the metabolism of theobromine, theophylline and caffeine in man.
J. Biol. Chem. 228 (1975) 315-323
- Domon, M., B. Barton, A. Porte und A.M. Rauth, The interaction of caffeine with ultra-violet-light-irradiated DNA.
Int. J. Radiat. Biol. 17 (1970) 395-399
- Epplen, J.T., J.W. Siebers und W. Vogel, DNA replication patterns of human chromosomes from fibroblasts and amniotic fluid cells revealed by a Giemsa staining technique.
Cytogenet. Cell Genet. 15 (1975) 177-185
- Goetz, P., R.J. Sram und J. Dohnalova, Relationship between experimental results in mammals and man.
1. Cytogenetic analysis of bone marrow injury induced by a single dose of cyclophosphamide.
Mutation Research 31 (1975) 247-354
- Goth, R. und J.E. Cleaver, Metabolism of caffeine to nucleic acid precursors in mammalian cells.
Mutation Research 36 (1976) 105-114

- Grover, P.L. und P. Sims, Enzyme-catalysed reaction of polycyclic hydrocarbons with deoxyribonucleic acid and protein in vitro.
Biochem. J. 110 (1968) 159
- Grover, P.L., A. Hewer und P. Sims, Formation of K-region epoxides as microsomal metabolites of pyrene and benzo-(a)pyrene.
Biochemical Pharmacology 21 (1972) 2713-2726
- Habers,
Henry, S.A., Nucleinsäuren, 2.Auflage Thieme Verlag 1975
Occupational cutaneous cancer attributable to certain chemicals in industry.
Brit. Med. Bull. 4 (1947) 389-407
- Hill, T., A. Tsuboi, R. Baserga, Effects of 5-bromodeoxyuridine on chromatin transcription in confluent fibroblasts.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71 (1974) 455-459
- Huberman, E., L. Aspiras, C. Heidelberger, P. Grover und P. Sims, Mutagenicity to mammalian cells of epoxides and other derivatives of polycyclic hydrocarbons.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68 (1971) 3195-3199
- Huberman, E., L. Sachs, Shen Y. Yang und H.V. Gelboin, Identification of mutagenic metabolites of benzo(a)-pyrene in mammalian cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 (1976) 607-611
- Huggins, C., L. Grand und R. Fukunishi, Aromatic influences on the yields of mammary cancers following administration of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 51 (1964) 737-742
- Hulbert, P.B., Carbonium ion as ultimate carcinogen of polycyclic aromatic hydrocarbons.
Nature 256 (1975) 146-148
- Hsu, T.C. und C.E. Somers, Effect of 5-bromodeoxyuridine on mammalian chromosomes.
Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash) 47 (1961) 396-403

- Kihlman, B.A., S. Sturelid, K. Norlen und D. Tidriks, Caffeine derivatives and chromosomal aberrations. *Hereditas* 69 (1971 b) 35-50
- Kihlman, B.A., Effects of caffeine on genetic material. *Mutation Research* 26 (1974) 53-71
- Kihlman, B.A., Sister chromatid exchanges in *Vicia faba*. II. Effects of thiotepa, caffeine and 8-ethoxycaffeine on the frequency of SCE's. *Chromosoma* 51 (1975) 11-18
- Kihlman, B.A. und S. Sturelid, Effects of caffeine on the frequencies of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges induced by chemical mutagens in root tips of *Vicia faba*. *Hereditas* 88 (1978) 35-41
- King, H.W.S., M.H. Thompson und P. Brookes, The benzo(a)pyrene deoxyribonucleoside products isolated from DNA after metabolism of benzo(a)pyrene by rat liver microsomes in the presence of DNA. *Cancer Research* 34 (1975) 1263-1269
- Latt, S.A., Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair: detection by fluorescence and induction by mitomycin C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (1974) 3162-3166
- Latt, S.A. und J.C. Wohleb, Optical studies of the interaction of Hoechst 33 258 with DNA, chromatin and metaphase chromosomes. *Chromosoma* 52 (1975) 297-316
- Lehman, A.R. und S. Kirk-Bell, Effects of caffeine and theophylline on DNA synthesis in unirradiated and UV-irradiated mammalian cells. *Mutation Research* 26 (1974) 73-82
- Lowry, D., W. Rowe, N. Teich und J. Hartley, Murine leukemia virus: High-frequency activation in vitro by 5-iododeoxyuridine and 5-bromodeoxyuridine. *Science* 174 (1971) 155-156

- Malaveille, C., T. Kuroki, P. Sims, P. L. Grover und H. Bartsch,
Mutagenicity of isomeric diol-epoxides of
benzo(a)pyrene and benz(a)anthracene in
S. Typhimurium TA 98 and TA 100 and in
V 79 Chinese hamster cells.
Mutation Research 44 (1977) 313-326
- Matter, B. E. und J. Grauwiler, Micronuclei in mouse bone marrow
cells. A simple in vivo model for the
evaluation of drug-induced chromosomal
aberrations.
Mutation Research 23 (1974) 239-249
- Mohn, G. R. und J. Ellenberger, Genetic effects of cyclophosphamide,
ifosfamide and trofosfamide.
Mutation Research 32 (1976) 331-360
- Natarajan, A. T., A. D. Tates, P. P. W. Van Buul, M. Meijers und N. De
Vogel, Cytogenetic effects of mutagens/
carcinogens after activation in a microsomal
system in vitro.
Mutation Research 37 (1976) 83-90
- Newbold, R. F. und P. Brookes, Exceptional mutagenicity of a
benzo(a)pyrene diol epoxide in cultured
mammalian cells.
Nature 261 (1976) 52-54
- Oesch, F., D. M. Jerina und J. Daly, A radiometric assay for hepatic
epoxide hydrase activity with 7- H^3 styrene
oxide.
Biochim. Biophys. Acta 227 (1971 a) 685-691
- Oesch, F., D. M. Jerina und J. W. Daly, Substrate specificity of
hepatic epoxide hydrase in microsomes and
in a purified preparation: Evidence for
homologous enzymes.
Arch. Biochem. Biophys. 144 (1971 b) 253-261
- Oesch, F., N. Kaubisch, D. M. Jerina und J. W. Daly, Hepatic epoxide
hydrase. Structure-activity relationship
for substrates and inhibitors.
Biochemistry 10 (1971 c) 4858-4866

- Oesch,F. und J.Daly, Solubilization, purification and properties of hepatic epoxide hydrase.
Biochim. Biophys. Acta 227 (1971 d) 692-697
- Oesch,F., D.M.Jerina und J.W.Daly, A reconstituted microsomal enzyme system that converts naphthalene to trans-1,2-dihydroxy-1,2-dihydronaphthalene via naphthalene-1,2-oxide: presence of epoxide hydrase in cytochrome P-450 and P-448 fractions.
Archives of Biochemistry and Biophysics 153 (1972) 62-67
- Oesch,F., N.Moreen und J.W.Daly, Genetic expression of the induction of epoxide and aryl hydrocarbon hydroxylase activities in the mouse by phenobarbital or 3-methylcholanthrene.
Molecular Pharmacology 9 (1973 a) 692-696
- Oesch,F.,
Review article: Mammalian epoxide hydrolases: Inducible enzymes catalysing the inactivation of carcinogenic and cytotoxic metabolites derived from aromatic and olefinic compounds.
Xenobiotica 3 (1973 b) 305-340
- Oesch,F.,
Purification and specificity of a human microsomal epoxide hydrase.
Biochem. J. 139 (1974) 77-88
- Oesch,F., P.Bentley und H.R.Glatt, Epoxide hydrase: Purification of apparent homogeneity as a specific probe for the relative importance of epoxides among other reactive metabolites. in: Biological reactive intermediates Formation, Toxicity and Inactivation. Ed.: D.J.Jollow, J.J.Kocsis, R.Snyder und H.Vainio
Plenum Press 1977

- Palitti,F. und A.Becchetti, Effects of caffeine on sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations induced by mutagens in Chinese hamster cells.
Mutation Research 45 (1977) 157-159
- Perry,P. und S.Wolff, New giemsa method for the differential staining of sister chromatids.
Nature 251 (1974) 156-158
- Perry,P. und H.J.Evans, Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange.
Nature 258 (1975) 121-125
- Puck,T.T., S.T.Cieciura und A.Robinson, Genetics of somatic mammalian cells. III.Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects.
J. Exp. Med. 108 (1958) 945-956
- Rieger,R. und A.Michaelis, Chromosomenmutationen
Fischer, Jena 1967
- Röhrborn,G. und J.Hansmann, Induced chromosome aberrations in unfertilized oocytes of mice.
Humangenetik 13 (1971) 184-198
- Sarrif,A.M., K.L.Mc Carthy, S.Nesnow und C.Heidelberger, Separation of glutathion S-transferase activities with epoxides from the mouse liver h-protein, a major polycyclic hydrocarbon-binding protein.
Cancer Research 38 (1978) 1438-1443
- Savage,J.R.K., Classification and relationship of induced chromosomal structural changes.
J. Medical Genetics 12 (1975) 103-122
- Schmid,W. und G.R. Staiger, Chromosome studies on bone marrow from Chinese hamsters treated with benzodiazepin transquillizers and cyclophosphamide.
Mutation Research 7 (1969) 99-108

- Sims, P., P.L.Grover, A.Swaisland und A.Hewer, Metabolic activation of benzo(a)pyrene proceeds by a diol-epoxide. *Nature* 252 (1974) 326-327
- Shafer, D.A., Replication bypass model of sister chromatid exchanges and implications for Bloom's syndrome and Fanconi's anemia. *Hum. Genetics* 39 (1977) 177-190
- Solomon, E. und M.Bobrow, Sister chromatid exchange - a sensitive assay of agents damaging human chromosomes. *Mutation Research* 30 (1975) 273-278
- Stockdale, F., K.Okazaki, N.Nameroff und H.Holtzer, 5-Bromodeoxyuridine: Effects on myogenesis in vitro. *Science* 146 (1964) 533-536
- Sutherland, E.W. und T.W.Rall, Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J. Biol. Chem.* 232 (1958) 1077-1091
- Swaisland, A.J., P.L.Grover und P.Sims, Reactions of polycyclic hydrocarbon epoxides with RNA and polynucleotides. *Chem. Biol. Interactions* 9 (1974) 317-326
- Taylor, J.H., Sister chromatid exchanges in tritium labeled chromosomes. *Genetics* 43 (1958) 515-529
- Thakker, D.R., H.Yagi, A.Y.Lu, W.Levin, A.H.Conney und D.M.Jerina, Metabolism of benzo(a)pyrene: Conversion of ($\pm$)-trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a)-pyrene to highly mutagenic 7,8-diol-9,10-epoxides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (1976) 3381-3385
- Tice, R., J.Chaillet und E.L.Schneider, Demonstration of spontaneous sister chromatid exchanges in vivo. *Exp. Cell Research* 102 (1976) 426-428

- Vogel, W. und Th. Bauknecht, Differential chromatid staining by
in vivo treatment as a mutagenicity test
system.
Nature 260 (1976) 448-449
- Weinstein, B., A. M. Jeffrey, K. W. Jennette, S. H. Blobstein,
Benzo(a)pyrene diol epoxides as intermediates
in nucleic acid binding in vitro and in vivo.
Science 193 (1976) 592-595
- Wislocki, P. G., A. W. Wood, R. L. Chang, W. Levin, H. Yagi, O. Hernandez,
D. M. Jerina und A. H. Conney, High mutagenicity
and toxicity of a diol-epoxide derived from
benzo(a)pyrene.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 68 (1976)
1006-1012
- Wolff, S. und P. Perry, Differential Giemsa staining of sister
chromatids and the study of sister chromatid
exchanges without autoradiography.
Chromosoma 48 (1974) 341-353
- Yang, S. K., P. P. Roller und H. V. Gelboin, Enzymatic mechanism of
benzo(a)pyrene conversion to phenols and
diols and improved high liquid chromatographic
separation of benzo(a)pyrene derivatives.
Biochemistry 16 (1977) 3680-3687

Diese Arbeit wurde am Institut für Humangenetik und Anthropologie der Medizinischen Einrichtungen der Universität Düsseldorf angefertigt.

Herrn Prof.Dr.G. Röhrborn danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, sowie für die theoretischen und praktischen Hinweise und Anregungen. Ganz besonders bedanke ich mich für die mir während dieser Zeit überlassene Assistentenstelle.

Herrn Prof.Dr.O. Hess danke ich für die Übernahme des Referats und die damit verbundene Vertretung dieser Arbeit vor der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Düsseldorf.

Lebenslauf

geboren: 18. April 1951 in Mönchengladbach

Eltern: Heinz Köcher und Maria Köcher geb. Hütz

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet mit Eckart Roszinsky, Studienrat

Ausbildung:

1957/65 Besuch der Volksschule in Mönchengladbach

1965/66 Besuch der Haushaltungsschule der Gewerblichen Schulen Mönchengladbach

1966/68 Erlangung der Fachschulreife an der Berufsaufbauschule der Staatlichen Handels- und Gewerbeschulen Rheydt

1968/69 Einjährige Berufsausbildung als Krankenpflegehelferin im Krankenhaus Maria Hilf in Mönchengladbach

1969/71 Erlangung der Hochschulreife am Erzbischöflichen Friedrich-Spee-Kolleg Neuß

SS 72 Beginn des Studiums der Biologie an der Universität Köln

Aug. 76 Abschluß des Biologiestudiums mit der Diplom-Hauptprüfung
Hauptfach: Genetik
1. Nebenfach: Biochemie
2. Nebenfach: Organische Chemie
Gesamtnote: sehr gut

Aug. 76 Beginn des Promotionsstudiums an der Universität Düsseldorf, Anfertigung der Dissertation im Institut für Humangenetik und Anthropologie

seit Okt. 76 wissenschaftliche Angestellte am oben genannten Institut

